

**Rezeptor-vermittelte Apoptose und
Entzündungsbegrenzung
Differenzielle Mobilisierung der CD69- und
CD95-abhängigen Signaltransduktionswege
in humanen eosinophilen Granulozyten**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der
Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Biol. Martin Förster

geboren am 10.08.1967 in Freiburg i. Br.

Gutachter:
Prof. Dr. R. Wetzker
Prof. Dr. Dr. C. Kroegel
Prof. Dr. W. König

Datum des Rigorosums: 09.03.2005

Datum der öffentlichen Verteidigung: 02.05.2005

ZUSAMMENFASSUNG

CD69 ist ein Typ-II-integrales Membranglykoprotein und gehört zur C-Typ-Lektinfamilie. Die strukturelle Verwandtschaft legt für CD69 eine Rolle als Rezeptor und damit vermutlich eine funktionelle Bedeutung für die Zelle nahe. Es wurde deshalb das Ziel verfolgt, den funktionellen Effekt der CD69-Rezeptor-Aggregation auf humanen eosinophilen Granulozyten in Hinsicht auf zelluläre und subzelluläre Änderungen im Zusammenhang mit der Apoptose zu analysieren. Zusätzlich sollten diese Ergebnisse mit den CD95-bedingten Änderungen verglichen werden. Da CD69 auf eosinophilen Granulozyten bisher als Aktivierungsmarker angesehen wird, sollte des Weiteren seine Bedeutung für die chronische Entzündung am Beispiel des Asthma bronchiale im Hinblick auf die Viabilität der eosinophilen Granulozyten, die die Haupteffektorzellen beim Asthma darstellen, untersucht werden.

Apoptose ist die häufigste Form des physiologischen Zelltodes bei eukaryotischen Mehrzellern und dient dazu, bestimmte atypische oder „unbrauchbar“ gewordene Zellen auf physiologische Weise zu eliminieren. Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die GM-CSF-induzierte Lebenszeit des eosinophilen Granulozyten durch die Ligation des CD69-Oberflächenrezeptors mittels anti-CD69-mAk neutralisiert werden kann. CD69-Engagement führt auf GM-CSF-stimulierten Eosinophilen zu den mit einer Apoptose assoziierten Veränderungen, wie „membrane blebbing“ und Fragmentierung des Nukleus („DNA-Leiter“). Die Expression von *bcl-2* führt zur Unterdrückung des Apoptoseprozesses in verschiedenen Zelltypen. Dessen Rolle in eosinophilen Granulozyten wird bisher kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass humane eosinophile Granulozyten das anti-apoptotische Protein *bcl-2* exprimieren. CD69- sowie CD95-Engagement führen zu einer Abnahme der *bcl-2*-Expression. Caspasen gelten als Initiator- und Effektormoleküle bei der apoptotischen Signalvermittlung der Zelle. Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren konnte hier dargestellt werden, dass an der CD69-Signaltransduktion bei eosinophilen Granulozyten die Caspase-9 beteiligt ist. Das CD95-Signal wird bei Eosinophilen jedoch über Caspase-8 vermittelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MMP-9 zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität GM-CSF-stimulierter eosinophiler Granulozyten führt. Der viabilitätssenkende Effekt des anti-CD69-mAk wurde in

Gegenwart von MMP-9 verstärkt. Dagegen hatte MMP-9 keinen nachweisbaren Einfluss auf die anti-CD95-mAk-induzierte Viabilitätssenkung eosinophiler Granulozyten.

Anhand der segmentalen Allergenprovokation (SAP), einem humanen Modell der allergischen Entzündung, konnte gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten nach Allergenexposition in den Atemwegen um ein Vielfaches akkumulieren und das Oberflächenantigen CD69 exprimieren, während Zellen aus dem Blut nur nach Stimulation mit GM-CSF und IFN- γ CD69 -Expression aufweisen. Demgegenüber wurde CD95 konstitutiv exprimiert. Diese Expression blieb von Allergenexposition und GM-CSF-Stimulation unbeeinflusst, während IFN- γ die CD95 -Expression erhöhte. Da die Matrix-Metalloproteinase MMP-9 beim Asthma eine bedeutende Rolle spielt, sollte ihr Einfluss auf den Phänotyp eosinophiler Granulozyten analysiert werden. Die MMP-9 hatte weder alleine noch nach GM-CSF-Stimulation auf die CD69- und CD95-Expression einen Einfluss. Die Expression von CD11b, das ebenfalls wie CD69 nach Stimulation hochreguliert wird, wurde nach Kostimulation von GM-CSF mit MMP-9 erhöht. Diese Ergebnisse belegen erstmals, dass der Phänotyp eosinophiler Granulozyten durch exogene MMPs moduliert wird. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist derzeit noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammengenommen beschreiben, definieren und charakterisieren die in dieser Arbeit dargestellten Experimente das CD69-Antigen als Apoptose-Rezeptor auf humanen eosinophilen Granulozyten. Es ergänzt somit einen anderen bereits bekannten Rezeptor-vermittelten Apoptose-Mechanismus, der mit dem CD95-Antigen assoziiert ist. Darüber hinaus konnten neue Einsichten zur Bedeutung Apoptose-relevanter Proteine, wie dem *bcl-2* und den Caspasen, beim eosinophilen Granulozyten gewonnen werden, die zum Verständnis der Viabilitätsregulation dieser Zelle beitragen. Aufgrund der Bedeutung der Apoptose für die Kontrolle der chronischen Entzündung verspricht die Kenntnis der hierbei operierenden Mechanismen ein neues Verständnis der inflammatorischen Prozesse. Darüber hinaus eröffnet sie möglicherweise einen alternativen anti-entzündlichen Behandlungsansatz für Eosinophilen-assoziierte Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale.

INHALT

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | i |
| Abkürzungsverzeichnis..... | v |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Apoptose (physiologischer Zelltod, programmierter Zelltod) | 1 |
| 1.2 Intrazelluläre Apoptose-assoziierte Signalwege | 2 |
| 1.3 Evolutionäre Bedeutung der Apoptose | 2 |
| 1.4 Ontogenetische Modelle | 3 |
| 1.5 Morphologie der Apoptose | 4 |
| 1.6 Nachweisverfahren von Apoptose | 4 |
| 1.7 Phagozytose apoptotischer Zellen | 6 |
| 1.8 Nekrose | 7 |
| 1.9 Apoptose oder Nekrose? | 7 |
| 1.10 Apoptose-Induktion..... | 8 |
| 1.11 Fehlregulation einzelner Apoptose-Proteine und Entstehung von Krankheiten | 10 |
| 1.12 Inhibitorische Rezeptoren des Immunsystems | 13 |
| 1.13 Apoptose als Regulator der chronischen Entzündung am Beispiel des Asthma bronchiale | 15 |
| 2 ZIELE DER ARBEIT..... | 17 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 3.1 Material..... | 20 |
| 3.1.1 Geräte..... | 20 |
| 3.1.2 Software..... | 20 |
| 3.1.3 Materialien für die Reinigung der eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut | 21 |
| 3.1.4 Medien, Stimulantien und Inhibitoren für die Zellkultur | 21 |
| 3.1.5 Antikörper und Reagenzien für die durchflusszytometrische Analyse | 22 |
| 3.1.6 Reagenzien für die Molekularbiologie | 22 |
| 3.1.7 Reagenzien für die konfokale Immunofluoreszenz- Mikroskopie..... | 23 |
| 3.1.8 Materialien für die segmentale Atemwegsprovokation und Aufarbeitung der bronchoalveolären Lavagen | 24 |
| 3.1.9 ELISA-Kit | 24 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.1.10 | Puffer und Lösungen | 24 |
| 3.2 | Reinigung der eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut | 25 |
| 3.3 | Zellkultur | 25 |
| 3.3.1 | Bestimmung des Effekts von MMP-9 auf die Oberflächenexpression und die Viabilität | 26 |
| 3.3.2 | Bestimmung der Caspasen-Abhängigkeit | 26 |
| 3.3.3 | Bestimmung der PI3K-Abhängigkeit | 26 |
| 3.3.4 | Bestimmung der CD95-Abhängigkeit der CD69-induzierten Apoptose | 27 |
| 3.4 | Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen | 27 |
| 3.5 | Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Proteine | 29 |
| 3.6 | Zell-Viabilitäts-Assay | 29 |
| 3.7 | Nachweis der mRNA-Expression | 29 |
| 3.8 | Konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie | 30 |
| 3.9 | Chromatin-Fragmentations-Assay | 30 |
| 3.10 | Probanden für die segmentale Allergenprovokation | 31 |
| 3.11 | Segmentale Atemwegsprovokation und bronchoalveoläre Lavage | 32 |
| 3.12 | Bestimmung der MMP-9-Expression in der BAL-Flüssigkeit per ELISA | 33 |
| 3.13 | Statistische Analyse | 33 |
| 4 | ERGEBNISSE | 34 |
| 4.1 | <i>In vitro</i> -Protein-Expression von CD69 auf eosinophilen Granulozyten | 34 |
| 4.2 | <i>In vitro</i> -mRNA-Expression von CD69 in eosinophilen Granulozyten | 37 |
| 4.3 | Einfluss der MMP-9 auf die CD69-Oberflächenexpression auf eosinophilen Granulozyten | 38 |
| 4.4 | Effekt der CD69- bzw. CD95-Ligation auf Überleben und Apoptose humaner Eosinophiler aus dem peripheren Blut | 40 |
| 4.5 | Einfluss der MMP-9 auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten | 44 |
| 4.6 | <i>Bcl-2</i> -Protein-Expression in humanen peripheren Blut-Eosinophilen | 47 |
| 4.7 | Vergleichende Expression Apoptose-relevanter Proteine in humanen eosinophilen Granulozyten | 50 |
| 4.8 | Beteiligung von CD95 an der CD69-induzierten Viabilitätsreduktion eosinophiler Granulozyten | 52 |
| 4.9 | Beteiligung der PI3K an der CD69-induzierten Viabilitätsreduktion eosinophiler Granulozyten | 53 |
| 4.10 | Effekt der Caspase-3-, -8- und -9-Inhibitoren auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten | 55 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.11 | Humanes Modell der allergischen Entzündung | 58 |
| 4.11.1 | Klinischer Aspekt | 58 |
| 4.11.2 | Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit | 58 |
| 4.11.3 | Gesamtzellzahl, Differenzialzytologie | 58 |
| 4.12 | Phänotyp eosinophiler Granulozyten <i>in vivo</i> | 61 |
| 4.13 | Zusammenfassung der Experimente zum Phänotyp humaner eosinophiler Granulozyten | 64 |
| 4.14 | MMP-9-Expression <i>in vivo</i> | 65 |
| 5 | Diskussion | 66 |
| 5.1 | Das CD69-Oberflächenantigen | 67 |
| 5.1.1 | CD69-Expression auf Immunzellen | 67 |
| 5.1.2 | CD69 als Zelltyp-spezifisches Oberflächenantigen..... | 68 |
| 5.1.3 | CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten | 69 |
| 5.1.4 | CD69 als Aktivierungsmarker auf eosinophilen Granulozyten | 70 |
| 5.1.5 | CD69-vermittelte Funktionen und Signaltransduktion | 71 |
| 5.2 | Todesliganden | 73 |
| 5.3 | Das CD95-Oberflächenantigen (Apo-1, Fas)..... | 74 |
| 5.3.1 | CD95-Expression auf Immunzellen | 74 |
| 5.3.2 | CD95-Expression auf eosinophilen Granulozyten | 77 |
| 5.4 | Vergleich der Funktion von CD69 und CD95 bei humanen eosinophilen Granulozyten | 79 |
| 5.5 | Vergleich der Signalwege der CD69- oder CD95-vermittelten Apoptose in eosinophilen Granulozyten | 80 |
| 5.5.1 | CD69 als Zelltyp-spezifischer Apoptose-Induktor | 80 |
| 5.5.2 | Intrazelluläre Signaltransduktion | 81 |
| 5.5.3 | Regulatorische Proteine des Apoptosesignalwegs | 82 |
| 5.5.4 | Rolle von <i>bcl-2</i> bei der Regulation des Überlebens und der Apoptose eosinophiler Granulozyten | 83 |
| 5.5.5 | Rolle von Caspasen bei der Regulation des Überlebens und der Apoptose eosinophiler Granulozyten | 87 |
| 5.6 | Modulation der Rezeptor-vermittelten Apoptose durch Proteasen | 90 |
| 5.7 | Medizinische und therapeutische Bedeutung der Ergebnisse | 92 |
| 5.7.1 | Apoptose als therapeutische Möglichkeit..... | 92 |
| 5.7.2 | Allergeninduzierte Migration des eosinophilen Granulozyten in das Bronchiallumen | 92 |
| 5.7.3 | Die Bedeutung eosinophiler Granulozyten für das Asthma bronchiale | 93 |
| 5.7.4 | Therapeutische Perspektive | 95 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.8 | CD69 als inhibitorischer Rezeptor | 96 |
| 5.9 | Experimentelle Kritik und Ausblick..... | 98 |
| 6 | LITERATUR | 100 |
| 7 | APPENDIX | 110 |
| 7.1 | Danksagung | 110 |
| 7.2 | Lebenslauf..... | 111 |
| 7.3 | Aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen | 112 |
| 7.4 | Selbstständigkeitserklärung..... | 114 |
| 7.5 | Erklärung zur Bewerbung | 115 |

Abkürzungen

| | |
|---------------------------|---|
| AICD | „activation induced cell death“ |
| AIDS | „acquired immune deficiency syndrome“ |
| AIF | apoptoseinduzierender Faktor |
| AIM | „activation/inducer molecule“ |
| ALPS | Autoimmunes Lymphoproliferationssyndrom |
| AP-1 | Aktivatorprotein-1 |
| Apaf-1 | „apoptotic protease activating factor 1“ |
| ATP | Adenosin Triphosphat |
| BAL | Bronchoalveoläre Lavage |
| <i>bcl-2</i> | „B-cell leukemia/lymphoma 2“ |
| Bp | Basenpaare |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| Ca | Calcium |
| CAD | caspaseaktivierte DNase |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| cDNA | „copy DNA“ |
| ced | „ <i>Caenorhabditis elegans</i> death“ |
| CEP | Chronische eosinophile Pneumonie |
| Colon-CA | Colon-Karzinom |
| crmA | „cytokine response modifier A“ |
| CTLA | „cytotoxic T-lymphocyte antigen“ |
| Cy5 | Cytochrom 5 |
| <i>D. pteronyssinus</i> | <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> |
| DAPI | „4',6-diamidino-2-phenylindole“ |
| dATP | Deoxy-Adenosin Triphosphat |
| DbcAMP | „dibutyryl cyclic adenosine monophosphate“ |
| DD | „death domain“ |
| DED | „death effector domain“ |
| DFF | „DNA fragmentation factor“ |
| DIABLO | „direct IAP binding protein of low Pi“ |
| DiIC ₁₈ (3)-DS | „1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine-5,5'-disulfonic acid“ |
| DISC | „death-inducing signaling complex“ |
| DNA | „desoxy-ribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxy-Nukleotid Triphosphat |
| EA-1 | „early activation antigen 1“ |
| ECM | „extra cellular matrix“ |
| ECP | „eosinophilic cationic protein“ |

| | |
|------------------|---|
| EDTA | „ethylene diamine tetraacetic“ |
| ELISA | „enzyme linked immunosorbent assay“ |
| EPO | Eosinophile Peroxidase |
| EPX | Eosinophiles Protein X |
| ERK | „extracellular signal-regulated kinase“ |
| FACS | „fluorescence activated cell sorter“ |
| FADD | „Fas associated protein with a DD“ |
| FCS | „fetal calf serum“, fötales Kälberserum |
| FEV ₁ | forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde (Einsekundenkapazität) |
| FITC | Fluoresceinisoithiocyanat |
| FLICE | „FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme“ |
| FLIP | „FLICE-inhibitory protein“ |
| fMLP | N-Formyl-L-Methyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin |
| GAGs | Glykosamine |
| GAPDH | „glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase“ |
| GM-CSF | „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“ |
| G-Protein | Guanin-Nukleotid-bindendes Protein |
| h | Stunde |
| IAP | Inhibitoren von Apoptose |
| iDC | „immature dendritic cells“, unreife Dendritische Zellen |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| ITIM | Immunrezeptor-Tyrosin-basierte inhibitorische Motive |
| JAK | Janus-Kinase |
| JNK | „c-Jun N-terminal kinase“ |
| jun | Onkogen des „avian sarcoma virus 17“ (ju-nana, japanisch:17) |
| KCl | Kalium-Chlorid |
| kDa | kilo Dalton |
| KU/l | kilo Units pro Liter |
| LE | „low electroendosmosis“ |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | Magnetic-Assisted-Cell-Sorting |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein-Kinase |
| MBP | „major basic protein“ |
| Mg | Magnesium |
| MHC | „major histocompatibility complex“ |

| | |
|------------------|--|
| min | Minute |
| MIP | „macrophage inflammatory protein“ |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| mRNA | „messenger RNA“ |
| MW | „molecular weight“, Molekulargewicht |
| NaCl | Natrium-Chlorid |
| NaOH | Natrium-Hydroxid |
| NFAT | „nuclear factor of activated T cells“ |
| NF κ B | Nukleärer Faktor für die κ -Kette B |
| NK-Zellen | Natürliche Killer-Zellen |
| NO | „nitric oxide“, Stickoxid |
| OVA | Ovalbumin |
| PAF | Plättchen-aktivierender Faktor |
| PARP | „poly (ADP-ribose) polymerase“ |
| p-Benzochinon | para-Benzochinon |
| PBS | „phosphate-buffered saline“ |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PD ₂₀ | Proteindosis, die einen 20%igen Abfall der FEV-1 bewirkt |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PE | Phycoerithrin |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3K | Phosphoinositid 3-Kinase |
| PKC | Protein-Kinase C |
| PLA ₂ | Phospholipase A2 |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (Phorbol-ester) |
| PNU | Protein-Stickstoff-Einheiten |
| PKB | Protein-Kinase B |
| PS | Phosphatidylserin |
| r | rekombinant |
| R | Rezeptor |
| RB | Rezeptorblocker |
| RNA | „ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure |
| RPMI | Roswell park memorial institute |
| RT-PCR | „reverse transcriptase polymerase chain reaction“ |
| SAP | segmentale Allergenprovokation |
| s | „soluble“, löslich |
| SDS | „sodium dodecyl sulfat“ |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| Shc | „src homology and collagen protein“ |
| SHP-2 | SH2-homologe Protein Tyrosin Phosphatase |

| | |
|---------------|--|
| SLE | Systemischer Lupus erythematodes |
| Smac | „second mitochondria-derived activator of caspase“ |
| SMF | Spezifische Mittlere Fluoreszenz |
| Src | „rous Asian sarcoma tyrosine kinase“ |
| SREBP | „sterol regulatory element binding protein“ |
| Syk | „spleen tyrosine kinase“ |
| TdT | terminale Desoxynucleotidyl-Transferase |
| TE | Tris/EDTA |
| TGF | „transforming growth factor“ |
| Th | T-Helfer-Zelle |
| TIMP | „tissue inhibitor of metalloproteinase“ |
| TLR | „toll-like receptor“ |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| TNF-R1 | Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 |
| TRADD | „TNFR-associated death domain“ |
| TRAIL | „TNF- α related apoptosis-inducing ligand“ |
| TUNEL | transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling |
| TWEAK | „TNF-like weak inducer of apoptosis“ |
| UV | ultraviolett |
| VEA | very early activation antigen |
| Z-DEVD-FMK | Z-Asp-Glu-Val-Asp-Fluoromethylketon |
| Z-IETD-FMK | Z-Ile-Glu-Thr-Asp-Fluoromethylketon |
| Z-LEHD-FMK | Z-Leu-Glu-His-Asp-Fluoromethylketon |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| Z-VAD-FMK | Z-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon |

1 EINLEITUNG

1.1 Apoptose (physiologischer Zelltod, programmierter Zelltod)

Der Begriff Apoptose kommt aus dem Griechischen ($\alpha\pi\sigma$ = herab, $\pi\tau\epsilon\iota\nu$ = fallen) und beschreibt den physiologischen Zelltod, der zum Herabfallen eines Baumblattes im Herbst führt. Im zellulären Kontext wurde der Begriff Apoptose erstmals im Jahre 1972 von dem australischen Pathologen John F. Kerr und Mitarbeitern verwendet⁸⁰.

Die Apoptose ist die häufigste Form des physiologischen Zelltodes bei eukaryotischen Mehrzellern und dient dazu, bestimmte atypische oder „unbrauchbar“ gewordene Zellen gezielt zu eliminieren. So werden genomisch veränderte Zellen, die für den Organismus potentiell schädlich geworden sind, gealterte Zellen oder solche, die durch funktionell unterschiedliche Zellen ersetzt werden, durch Apoptose beseitigt. Diese Elimination erfolgt „geordnet“ und ohne Störung der Homöostase des Gesamtorganismus. Die Apoptose hat eine wesentliche Bedeutung für die Entwicklung und das Wachstum eines Organismus. Denn eine normale Embryogenese setzt voraus, dass manche ursprünglich angelegte Zellen im Verlauf der Entwicklung gezielt wieder entfernt werden. Erst damit ist die Entwicklung differenzierter Gewebe möglich. Ebenso spielt die Apoptose bei der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase (z.B. im Rahmen der notwendigen Regeneration von Geweben) sowie bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems eine wesentliche Rolle. Des Weiteren begrenzt die Apoptose zellvermittelte Immunantworten und sorgt dafür, dass eine immunologische Reaktion nicht unkontrollierbar wird. Einzelne Autoimmunerkrankungen gehen auf eine gestörte Apoptose zurück, was deren Bedeutung noch hervorhebt. Intakte und nicht-überflüssige Zellen können aber auch durch Apoptose vernichtet werden, wenn im Rahmen maligner Erkrankungen Tumorzellen die Regulation des Mikromilieus übernehmen.

Der Begriff der Apoptose, der zunächst morphologisch geprägt wurde, wird heute generell für den physiologischen Zelltod verwendet. Da dieser Vorgang nach einem uniformen bzw. definierten Schema abläuft und nicht dem Zufall überlassen ist, wurde gleichbedeutend der Begriff des „programmierten Zelltods“ geprägt.

1.2 Intrazelluläre Apoptose-assoziierte Signalwege

Der intrazellulär mit der Apoptose assoziierte Signalweg ist in allen Körperzellen komplett vorhanden und führt binnen Minuten oder weniger Stunden zum Zelltod und zur Elimination der Zelle. Dafür liegt der Großteil der an der Apoptose beteiligten Proteine bereits in inaktiver Form in der Zelle vor und muss nur noch rekrutiert werden.

Der Signalweg gliedert sich in drei Phasen. In der „Initiatorphase“ empfängt die Zelle das Signal, zu sterben. In der 2. Phase („Effektorphase“) werden die Effektorsysteme aktiviert, die von Regulatorproteinen kontrolliert werden und den Zelltod herbeiführen. In der letzten Phase („Eliminationsphase“) wird der Zelldetritus von benachbarten Phagozyten aufgenommen.

Aus subzellulärer Sicht handelt es sich bei der Apoptose um einen komplexen Vorgang, an dessen Regulation

- Caspasen (Cystein-Proteasen) ¹⁵¹,
- Kinasen (PI-3-Kinase, Proteinkinase-B) ¹¹⁵,
- Apoptose-Suppressoren (*bcl-2*, *bcl-x_L*) ²,
- Apoptose-Induktoren (*bad*, *bax*, *bik*, *bcl-x_S*) ²,
- Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die Protoonkogene p53, c-myc und c-fos, und
- bestimmte Membranrezeptoren (z.B. CD95 (Apo-1, Fas), TNF- α) ⁶ beteiligt sind.

Der Signalweg der *bcl-2*-Familie-Proteine (Abschnitt 5.5.4), die Rolle der Caspasen (Abschnitt 5.5.5) und der CD95-assoziierte Signalweg (Abschnitt 5.3) werden in der Diskussion eingehender behandelt. Die Interaktion zwischen den für den Ablauf einer Apoptose genannten Faktoren erfolgt *in vivo* abhängig von Zelltyp, Zellzyklus und Apoptose-Induktoren unterschiedlich.

1.3 Evolutionäre Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose und ihre Regulation hat eine wesentliche Bedeutung bei der Ontogenese. Ohne apoptotischen Zelltod ist prinzipiell keine individuelle Entwicklung möglich. So ist z.B. der apoptotische Abbau des embryonal angelegten Interdigitalgewebes („Schwimnhäute“) zwischen Fingern und Zehen während der

Embryogenese entscheidend für die Funktionsfähigkeit der Gliedmaßen und damit für die Überlebens- und Fortpflanzungsfähigkeit des Individuums. Umgekehrt erhöht z.B. eine gestörte Apoptose im Rahmen immunologischer Vorgänge die Anfälligkeit für Krankheiten bzw. führt zu einer verstärkten Ausprägung der Erkrankung. Dadurch sinkt letztlich auch der individuelle Fortpflanzungserfolg. Somit ist das Funktionieren der Apoptose auch für evolutionäre Vorgänge von entscheidender Bedeutung.

Im Laufe der Phylogenie hat sich die Apoptose parallel mit der zunehmenden Komplexität der Organismen weiterentwickelt. Bei einfachen Metazoa, wie z.B. dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dient die Apoptose im wesentlichen der ontogenetischen Entwicklung der beim erwachsenen Individuum streng determinierten Körperstruktur. Zusätzlich kommen ihr bei komplexer organisierten Organismen vielfältige Aufgaben zu, wie etwa bei der Gewebemöostase und der Regulation des Ablaufs von Immunreaktionen. Entsprechend den vielfältigen Funktionen hat sich ein ganzes Arsenal unterschiedlicher Apoptosemechanismen und -signalwege entwickelt, dessen Feinregulation von essentieller Bedeutung für das Funktionieren des gesamten Organismus ist.

1.4 Ontogenetische Modelle

Der physiologische Zelltod ist ein evolutionär hochkonservierter Vorgang. Für die Untersuchung der intrazellulären Apoptosesignalkaskade des Menschen sind zwei Modelle von phylogenetisch einfacher strukturierten Lebewesen hilfreich. Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind die Gene *reaper*, *grim* und *hid* für die normale Durchführung des Zelltodes notwendig. Bei Mutationen oder Deletionen dieser Gene entstehen Fliegen mit überzähligen Augenzellen. Der Nematode *C. elegans* bildet insgesamt 1090 Zellen, von denen während seiner Entwicklung 131 Zellen zu exakt definierten Zeitpunkten absterben. Die hierfür verantwortlichen Gene werden als die sogenannten „ced“-Gene (ced für **C. elegans death**) bezeichnet, deren Proteine den Zelltod herbeiführen. Beim Menschen finden sich Proteine, die denen von Wurm und Fliege so ähnlich sind, dass sie wahrscheinlich phylogenetisch auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgehen.

1.5 Morphologie der Apoptose

Im Gegensatz zur Nekrose (siehe Abschnitt 1.8) handelt es sich bei der Apoptose um einen geordneten oder kontrollierten Zelltod. Aus diesem Grund lassen sich auch definierte morphologische Veränderungen identifizieren. Bei der Apoptose schrumpft die Zelle und gleichzeitig verlieren ihre Organellen an Volumen¹³⁶. Dabei geht die zelluläre Adhäsionsfähigkeit verloren und adhärente Zellen runden sich ab. Teile der Zellmembran ebenso wie der Kernmembran stülpen sich ein („membrane blebbing“) und schnüren kleine, membranumschlossene Zellfragmente („apoptotic bodies“) ab. Diese apoptotischen Zellkörperchen werden von den Nachbarzellen phagozytiert, ohne dass es zu einer perifokalen Entzündungsreaktion kommt, da bei der Apoptose im Unterschied zur Nekrose die Freisetzung von Zellinhaltsstoffen ausbleibt. Somit hinterlässt die Apoptose im Gegensatz zur Nekrose praktisch keine Spuren im umliegenden Gewebe.

Parallel zum „membrane blebbing“ kommt es zu einer Chromatin-Kondensation und einer endonukleotidischen Fragmentierung der DNA zwischen den Nukleosomen, wobei DNA-Stücke unterschiedlicher Länge entstehen, die jeweils ein Vielfaches von ca. 180-200 bp (Windung der DNA um ein Nukleosom) beträgt. In einem frühen Stadium der Apoptose wird das normalerweise an der zytosolischen Membranseite eingelagerte Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite transloziert (Phosphatidylserin-Flip). Das auf der äußeren Zellmembran exponierte Phosphatidylserin ist ein Signal zur Phagozytose der „apoptotic bodies“ durch Makrophagen⁴⁰.

Da der Prozess des apoptotischen Zelltods binnen weniger Stunden abgeschlossen ist und keine Spuren hinterlässt, lassen sich nur sehr wenige apoptotische Zellen in einem Gewebeschnitt identifizieren. Selbst im Thymus, in dem ca. 95 % der produzierten Zellen absterben, bleibt dies in Gewebeschnitten weitgehend unbemerkt.

1.6 Nachweisverfahren von Apoptose

Eine Apoptose lässt sich durch verschiedene Methoden nachweisen. Hierzu zählen

Mikroskopie, gelelektrophoretische Darstellung der „DNA-Leiter“, TUNEL-Assay und Annexin-Färbung.

Die ursprünglichste Methode, Apoptose nachzuweisen, ist die mikroskopische Bestimmung der morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen (Zellschrumpfung, „membrane blebbing“, „apoptotic bodies“, Nukleus-Fragmentierung).

Zum Nachweis eines frühen Apoptosestadiums wird Annexin-V eingesetzt, das spezifisch an das exponierte Phosphatidylserin bindet und mit verschiedenen Färbemethoden (z.B. mittels Fluoreszenz-Markierung durch FITC) identifiziert werden kann.

Die genomische DNA wird spät im Verlauf der Apoptose von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonukleasen spezifisch in der Linkerregion zwischen den Nukleosomen enzymatisch geschnitten. Hierbei entstehen DNA-Fragmente, deren Größe jeweils ein Vielfaches von ca. 180-200 bp beträgt. In einem nach der Molekülgröße auftrennenden Agarosegel führt dies zu einem regelmäßigen Muster, das mit einer Leiter vergleichbar ist. Das Vorhandensein dieser sogenannten „DNA-Leiter“ bildet einen Hinweis auf einen apoptotischen Zelltod. Im Gegensatz dazu findet während der Nekrose ein zufälliger enzymatischer Abbau genomischer DNA statt, der in der Gelelektrophorese als „Schmier“ sichtbar wird, was auf die völlig beliebige Molekülgröße der DNA-Fragmente zurückgeht. Dieses Muster der Leiter im Agarosegel kann herangezogen werden, um zwischen Nekrose und Apoptose zu differenzieren.

Auf der kontrollierten Zerlegung genomischer DNA während der Apoptose basiert ein weiteres Nachweisverfahren, das bei Gewebeschnitten angewendet wird. Bei der TUNEL-Färbung (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling) wird durch das Enzym „terminale Desoxynucleotidyl-Transferase“ (TdT) an DNA-Bruchstücke apoptotischer Zellen ein biotinmarkiertes dUTP gekoppelt. Biotin kann dann über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise lassen sich apoptotische von nicht-apoptotischen, d.h. gesunden, Zellen unterscheiden.

1.7 Phagozytose apoptotischer Zellen

Das Immunsystem spielt die zentrale Rolle bei der Erkennung und Vernichtung eindringender Pathogene. In diesem Zusammenhang ist eine große Zahl sogenannter Mustererkennungsmoleküle identifiziert worden. Zu diesen gehören lösliche Moleküle, wie z.B. Komplementfaktoren, Mitglieder der Collectin-Familie und der Pentraxin-Familie, ebenso wie membrangebundene Rezeptoren, z.B. Mitglieder der „toll-like-receptor“-Familie (TLR) und der C-Typ-Lektine. Mustererkennungsmoleküle sind nicht nur an der Pathogen-Elimination beteiligt, sondern ebenso an der Beseitigung apoptotischer Zellen. Die unmittelbare Entfernung apoptotischer Zellen wird durch frühzeitig auftretende Veränderungen ihrer Oberfläche geregelt. Darüber hinaus setzen Zellen während des apoptotischen Prozesses Chemokine frei, wie z.B. IL-8 oder MIP-1 α . Diese dürften die Akkumulation der Makrophagen um die apoptotischen Zellen fördern und eine rasche Elimination ermöglichen¹⁰⁹. Apoptotische Zellen werden von professionellen Phagozyten aufgenommen, wie z.B. Makrophagen oder unreifen Dendritischen Zellen (iDC). Aber auch nicht-professionelle phagozytische Nachbarzellen können an diesem Prozess beteiligt sein. Durch die Identifikation involvierter Moleküle und zugrunde liegender Prozesse werden Parallelen zwischen der Beseitigung apoptotischer Zellen und der angeborenen Abwehr von pathogenen Mikroben deutlich. Dadurch ergibt sich auch eine neue Perspektive für das Verständnis immunologischer Toleranzmechanismen.

Ein frühzeitig stattfindendes Ereignis während des apoptotischen Prozesses ist der Verlust der Phospholipid-Asymmetrie der Zellmembran. Diese führt zur Exposition von Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC) auf der externen Membranoberfläche. Diese Exposition bestimmter Phospholipide spielt eine wesentliche Rolle bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten, die über membrangebundene Rezeptoren, wie z.B. den PS-Rezeptor³⁹ und mehrere Scavenger-Rezeptoren^{51,113}, vermittelt wird. Zusätzlich binden Phagozyten über verschiedene lösliche Opsonine an apoptotische Zellen. So sind Tiere, denen der PS-Membranrezeptor fehlt, nicht in der Lage, apoptotische Zellen zu beseitigen, was eine abnormale Entwicklung und den neonatalen Tod zur Folge hat⁹⁶. Bei Mäusen ebenso wie bei Menschen geht eine

Hemmung der Elimination apoptotischer Zellen mit der Entwicklung einer dem Systemischen Lupus erythematoses (SLE) gleichenden Autoimmunerkrankung einher. Diese Beobachtung unterstreicht die physiologische Rolle der Apoptose.

1.8 Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose handelt es sich bei der Nekrose um einen unkontrollierten Zelltod durch exogene Einflüsse. Verbrennungen, Toxine, Strahlung oder mechanische Verletzungen können eine Nekrose auslösen. Auch eine zu hohe Temperatur oder eine mangelnde Sauerstoffversorgung, z.B. nach einer Apoplexie, führen zum nekrotischen Zelltod. Eine Nekrose ist daher in der Regel ein pathologischer Prozess, was sie grundsätzlich von dem physiologischen Vorgang der Apoptose unterscheidet.

Diese äußeren schädigenden Einflüsse führen in größeren Bereichen des Gewebes zur Kondensation des Nukleus und zum Anschwellen der Zellorganellen. In der Folge platzt die Zelle durch Schädigung der Plasmamembran. Dadurch werden Stoffe aus dem Zytoplasma frei, die Phagozyten aktivieren und damit sekundär eine Entzündungsreaktion auslösen. Ein vergleichsweise weit verbreitetes und jedem bekanntes Beispiel für eine Nekrose bildet der Sonnenbrand. Er geht auf eine übermäßige UV-Exposition der Epidermis durch Sonnenstrahlen zurück, die ihre Zellen irreversibel schädigen. Daraufhin werden die Zellen nekrotisch und rufen eine kutane Entzündung mit den charakteristischen Zeichen Rubor, Palor, Calor, Tumor und Functio laesa hervor.

1.9 Apoptose oder Nekrose?

Ob eine Zelle mit Apoptose oder Nekrose auf eine Stimulation reagiert, ist oft nicht eine Frage der Qualität des einwirkenden Signals, sondern vielmehr von dessen Intensität oder Dosis abhängig. Je intensiver ein „toxischer“ Stimulus ist, desto wahrscheinlicher stirbt die Zielzelle über Nekrose. So findet im Zentrum eines Myokardinfarktes ein nekrotischer Zelluntergang statt, während in den Randregionen die Myozyten an einer Apoptose zugrunde gehen. In hohen Dosen lösen Zytostatika

grundsätzlich eine Nekrose aus. Aber in den Konzentrationen, die therapeutisch im Gewebe des Patienten erreicht werden, induzieren sie den Zelltod vorwiegend über eine Apoptose. Bisher ist noch wenig bekannt, an welchem Punkt der intrazellulären Signaltransduktion der Schalter umgelegt wird, ob die Zelle über Apoptose oder über Nekrose zugrunde geht. In neuronalen Zellen konnte gezeigt werden, dass der Ablauf des Apoptoseprogramms ATP-abhängig ist und dass bei einem ATP-Mangel auf Nekrose umgeschaltet wird. Eine Übersicht über die Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: Vergleich Apoptose - Nekrose

| | Apoptose physiologischer Zelltod | Nekrose pathologischer Zelltod |
|---|---|--|
| Stimuli | physiologisch | pathologisch (Noxe) |
| Reversibilität | partiell möglich | nein |
| Regulierter Prozess | ja | nein |
| Zellkern | Pyknose, Fragmentation | Karyolyse |
| DNA-Spaltung | internukleosomal | zufällig, diffus |
| Zellvolumen | verkleinert | vergrößert |
| Zellmembran | intakt | zerstört |
| Lysosomale Enzyme | keine Freisetzung/ Phagozytose | frühzeitige Freisetzung in die Umgebung |
| Phosphatidylserin-Flip | ja | nein |
| Phagozytose | ja („apoptotic bodies“) | nein |
| Entzündliche Begleitreaktion | nein | ja |

1.10 Apoptose-Induktion

Die intensive Forschung auf dem Gebiet der Apoptose hat das Ziel, diese Art des Zelltods nicht nur zu verstehen, sondern auch zu beeinflussen. So wäre es wünschenswert, die Apoptose zu kontrollieren, d.h. sie je nach Ziel entweder zu induzieren oder zu inhibieren. Da die Apoptose durch die Aktivierung intrazellulärer

Signalkaskaden vermittelt wird, ist eine Voraussetzung für die Kontrolle, die Apoptose-Trigger oder die Verarbeitung des extrazellulären und intrazellulären Apoptosesignals zu identifizieren.

Die derzeitigen Kenntnisse der Signaltransduktionsmechanismen apoptotischer Zellen wurden überwiegend an etablierten Zelllinien gewonnen. Zum Beispiel stellen Resistenzen gegenüber Zytostatika bei der Behandlung von malignen Tumoren ein häufiges Problem dar. Eine Zytostatika-Resistenz mit Hemmung der Apoptose kann primär bestehen oder sekundär erst im Verlauf der Therapie erworben werden. Die Ursache ist oft eine Veränderung in der intrazellulären Apoptosesignalkaskade. Mit einer besseren Kenntnis dieser Prozesse wäre es auch grundsätzlich möglich, die Sensitivität der malignen Zellen gegenüber der Apoptose wiederherzustellen oder eine Resistenzentwicklung a priori zu vermeiden.

Eine breite Palette verschiedenster Stimuli kann nach Kontakt mit der Zielzelle eine Apoptose auslösen (Abbildung 1.1). Der apoptotische Prozess wird durch Bindung eines Todesliganden an Rezeptoren der Zielzelle exogen oder durch nicht-Rezeptor-vermittelte Reize endogen ausgelöst. So wirken Wachstumsfaktoren nicht nur positiv auf die Proliferation, sondern beeinflussen das Gleichgewicht zwischen zellulärer Proliferation und Zelltod auch dadurch, dass sie Apoptose verhindern. Apoptoseinduktion durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren und/oder Überlebensfaktoren wird als „death by default“ bezeichnet. Die Signaltransduktion im Rahmen der Apoptose besteht aus verschiedenen Proteasen und anderen Proteinen, die im Sinne einer Signalkaskade miteinander verknüpft sind.

Zu den bekanntesten Membranrezeptor-vermittelten Apoptosemechanismen gehören das Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α /TNF-R1- und das CD95L/CD95R-System. In beiden Fällen handelt es sich um ubiquitär vorkommende Faktoren, die auf verschiedene Zelltypen wirken.

Aus therapeutischer Sicht von besonderem Interesse sind jedoch Ansätze, die auf zelltypspezifischen Apoptosemechanismen beruhen und deren Aktivierung zu keinen oder nur geringen Nebenwirkungen führt. Darüber hinaus sollte die Apoptose möglichst einfach durch eine extern verabreichte Substanz induzierbar sein, was z.B.

bei Lungenerkrankungen durch Inhalation von Antikörpern erfolgen kann.

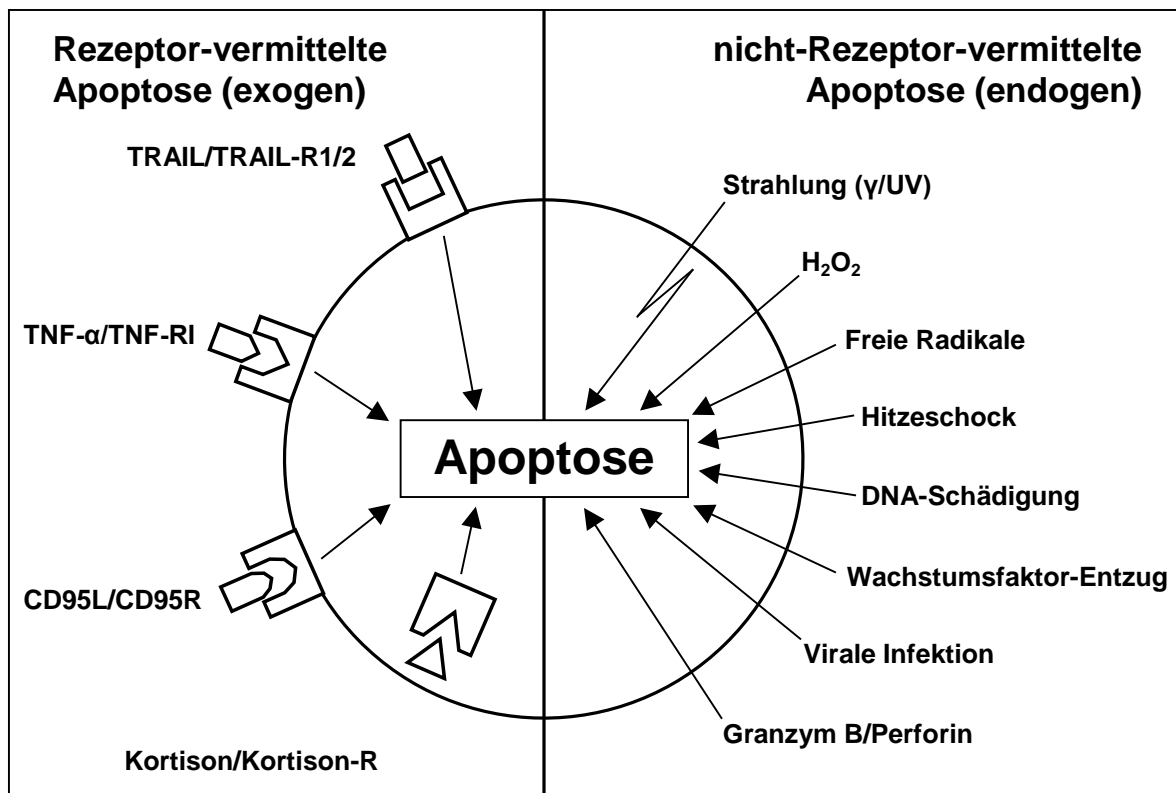


Abbildung 1.1: Rezeptor- und nicht-Rezeptor-vermittelte Apoptose-Induktoren (Trigger)

1.11 Fehlregulation einzelner Apoptose-Proteine und Entstehung von Krankheiten

Generell kann die Apoptose als ein der Proliferation entgegengerichteter Prozess betrachtet werden, der eine quantitative Balance oder ein numerisches Zellgleichgewicht herstellt (Abbildung 1.2). Eine anhaltende Störung dieser Balance entweder auf Seiten der Apoptose oder der Proliferation führt zu krankhaften Prozessen (Tabelle 1.2).

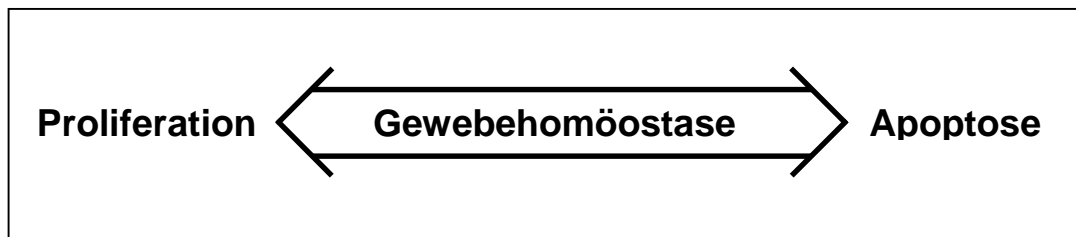


Abbildung 1.2: Beziehung zwischen Apoptose und Proliferation bei der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase.

Tabelle 1.2: Auf eine Störung der Apoptose zurückgehende Erkrankungen.

| Akzelerierte Apoptose | Inhibierte Apoptose |
|-------------------------------|---------------------------|
| AIDS | Asthma bronchiale |
| Aplastische Anämie | Hypereosinophiles Syndrom |
| Chronisch-virale Hepatitis | Lupus erythematoses |
| Colitis ulcerosa | Lymphome |
| Diabetes mellitus Typ I | Leukämie |
| Hashimoto Thyreoiditis | M. Basedow |
| Malignome (Melanom, Colon-CA) | Rheumatoide Arthritis |
| Multiple Sklerose | |
| Myelodysplastisches Syndrom | |

- ¹²² Peter et al., PNAS 1997; 94:12736
¹³⁹ Spinozzi et al., Ann Intern Med 1998; 128:363
⁶⁹ Jayaraman et al., J Immunol 1999; 162:1717

So führt die Steigerung der Proliferation relativ zur Apoptoserate zu malignem Tumorwachstum. Dagegen verursacht eine Akzeleration der Apoptose relativ zur Proliferationsrate eine Neurodegeneration oder AIDS. Andererseits kommen Schwankungen dieser Balance zwischen Proliferation und Apoptose auch im Rahmen protektiver Mechanismen vor. Bei Entzündungsreaktionen, z.B. als Folge eines mikrobiellen Agens, trägt die verzögerte Apoptose inflammatorischer Zellen zu deren Akkumulation bei. Der Organismus wird u.a. hierdurch in die Lage versetzt, das Pathogen effizient zu eliminieren.

Aber auch aus einer Dysregulation der an der Übermittlung oder Regulation des

Apoptosesignals beteiligten Proteine resultiert ein pathologischer Zustand. Wichtige Erkenntnisse über die Rolle einzelner, mit der Apoptose assoziierter Proteine bei der Entstehung von Krankheiten wurden tierexperimentell gewonnen. Molekulargenetische Techniken ermöglichen es, einzelne Gene, z.B. in Mäusen, gezielt auszuschalten, so dass diese Mäuse sich von Kontrolltieren nur dadurch unterscheiden („Knock-out“-Tiere).

Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Cysteiny-Aspartasen). Die aktivierte Caspase triggert eine zur Apoptose führende Signalkaskade. Beim Menschen sind bisher 14 verschiedene Caspasen bekannt, die in Signalkaskaden angeordnet sind.

Mäuse, die kein normales Caspase-3-Protein synthetisieren können, sind nicht überlebensfähig. Sie sterben in der frühen Embryogenese an neurologischen Entwicklungsstörungen und schweren zentralnervösen Defekten. Ein ähnlicher Phänotyp findet sich auch bei Caspase-8- oder „apoptotic protease activating factor 1“ (Apaf-1)-Knock-out-Mäusen. Es ist somit denkbar, dass auch beim Menschen Entwicklungsdefekte des ZNS auf Apoptosedefekte zurückgehen. Allerdings wurden hierdurch pathogenetisch definierte Krankheiten bislang noch nicht beschrieben.

Ein Beispiel für die Rolle verminderter Apoptose bei der Tumorentstehung bietet das Protoonkogen *bcl-2*. *Bcl-2* wurde am sogenannten „Bruchpunkt“ der Translokation t(14;18) in B-Zell-Lymphomen entdeckt und ist in Tumoren häufig überexprimiert. Da *bcl-2* anti-apoptotisch wirkt, senkt überexprimiertes *bcl-2* die Apoptoserate und ermöglicht eine Verlängerung der zellulären Überlebenszeit. Expressions- oder Funktionsdefekte von Apoptoseproteinen sind an der primären oder sekundären Resistenz von Malignomzellen gegenüber Therapie (Chemotherapie, Bestrahlung) beteiligt.

Patienten mit Mutationen im CD95-Gen (für CD95L bisher nicht nachgewiesen) sind nicht in der Lage, T-Lymphozyten in normaler Weise zu eliminieren. Dies führt klinisch zu einer Autoimmunerkrankung, die als „Autoimmunes Lymphoproliferationssyndrom“ (ALPS) bezeichnet wird und durch eine Zytopenie,

Hypergammaglobulinämie sowie Nephritis gekennzeichnet ist.

Im Mausmodell konnte ferner gezeigt werden, dass die Hemmung der Apoptose durch einen Defekt im CD95-System vor dem Verlust der Pankreasinseln und der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I schützt.

In ischämischen Arealen nach einem Hirn- oder Herzinfarkt werden Apoptoseproteine sowie Todesliganden vermehrt und anti-apoptotische Proteine, wie z.B. FLICE-inhibitory protein (FLIP), vermindert exprimiert. Dies führt zum Absterben überlebender Zellen. Es ist unklar, ob dabei nur geschädigte Zellen zum Schutz des Organismus ausgesondert werden, oder auch gesunde Zellen in einer überschießenden Reaktion verloren gehen.

1.12 Inhibitorische Rezeptoren des Immunsystems

Mit der zunehmenden Beschreibung und Analyse verschiedener inhibitorischer Rezeptoren lymphoider und myeloider Zelllinien hat sich ein neues Paradigma etabliert, das einen Regulationsmechanismus des Immunsystems beschreibt. Dieses Paradigma verdeutlicht, dass erst das Zusammenwirken der gegensätzlich orientierten Signale „Aktivierung“ und „Inhibition“ die reguläre Abfolge von Initiierung, Amplifikation und Terminierung der Immunantwort ermöglicht. In einigen Fällen erkennen die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren ähnliche Liganden, und das Netto-Ergebnis des Kontaktes mit dem Liganden wird durch die relative Potenz der gegenläufigen Signale bestimmt. Die Bedeutung von aktivierenden und inhibierenden Signalen für die Integrität des Organismus wird durch die letal verlaufenden Immunerkrankungen bei Mäusen mit funktionsuntüchtigen inhibitorischen Rezeptoren gezeigt¹². Die Relevanz dieser inhibitorischen Rezeptoren für den Organismus wird darüber hinaus durch die Konservierung der sogenannten Immunrezeptor-Tyrosin-basierten inhibitorischen Motive (ITIM) während der Evolution offenbar.

Ein Kennzeichen des Immunsystems von Säugetieren ist deren Fähigkeit zum Aufbau und Erhalt eines feinregulierten Gleichgewichtes zwischen den beiden

Extremen, der Reaktivität auf der einen Seite und der Ruhe auf der anderen. Das heisst unter anderem für das Immunsystem, zu jedem Zeitpunkt in der Lage zu sein, ein Arsenal von zytotoxischen Zellen und Molekülen freizusetzen, um den Organismus vor Pathogenen zu schützen. Gleichzeitig müssen Mechanismen zur Verfügung stehen, mit denen der Organismus die Kontrolle über diese potentiell letale Antwort behält.

Ein Schlüsselaspekt dieser Fähigkeit liegt in der Spezifität der Immunantwort, die organismusfremde Zielmoleküle adressiert, während sie gleichzeitig die Integrität des Organismus selbst gewährleistet. Von ebenso großer Bedeutung ist die Fähigkeit des Organismus, die Immunantwort zu begrenzen und wieder zu beenden, was z.B. die Inaktivierung oder Terminierung von relevanten Mechanismen beinhaltet, die nach der Elimination des auslösenden Agens nicht mehr benötigt werden.

Obwohl viele Aspekte der positiven Signalvermittlung beim Aufbau einer effektiven Immunität beschrieben wurden, sind die Kenntnisse von Art und Funktion gegenläufiger inhibitorischer Mechanismen nach wie vor begrenzt. Die Analyse einiger inhibitorischer Rezeptoren hat aber bereits heute zur Formulierung eines neuen, zentralen Paradigmas geführt, bei dem „Aktivierung“ und „Inhibition“ als Paar zusammengehören, um Immunreaktionen in der oben beschriebenen Form zu modulieren bzw. zu regulieren^{11,59,97}. Der Verlust an inhibitorischen Signalen ist mit einer Autoreaktivität und einer ungehemmten Entzündungsreaktion assoziiert, was die Rolle der Feinregulation von inhibitorischen und permissiven Signalen bei der Immunregulierung verdeutlicht^{12,25,116}. Beispiele für solche Aktivierungs-Inhibitions-paare bilden die Immunglobulin-G-Fc-Rezeptoren, inhibitorische B-Zell-Rezeptoren, inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren (Typ II Membran-Glykoproteine der C-Typ-Lektin-Familie) für MHC-Klasse I-Moleküle oder andere inhibitorische Rezeptoren auf myeloiden Zellen.

1.13 Apoptose als Regulator der chronischen Entzündung am Beispiel des Asthma bronchiale

Im Rahmen chronisch-entzündlicher Erkrankungen vermitteln Effektorzellen die spezifischen Gewebeveränderungen bzw. -schäden und bestimmen hierdurch Schweregrad und Verlauf der Krankheit^{15,86,137}. Beim Asthma bronchiale und anderen allergischen Erkrankungen bestimmt der eosinophile Granulozyt als zentrale Effektorzellen am distalen Ende der Immunantwort die klinische Ausprägung. Die pathogenetische Bedeutung der Zelle erstreckt sich vor allem auf

- die allergische Spätreaktion,
- die Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität,
- eine lokale Epithelschädigung und
- die subepitheliale Fibrosierung der Atemwege (Airway-Remodelling) und damit die Langzeitschädigung der Lunge^{7,165}.

An der Vermittlung der Effektorfunktionen des eosinophilen Granulozyten sind vor allem die basischen Proteine (MBP, ECP, EPX), die eosinophile Peroxidase (EPO) sowie Sauerstoffradikale (OH^- , O_2^- , O^-) beteiligt, die direkt für die charakteristische Zerstörung der Bronchialepithelzellen verantwortlich gemacht werden^{52,88}. Ferner bildet der eosinophile Granulozyt mehrere *de novo* synthetisierte Lipidmediatoren, die die Vasodilatation, die Gefäßwandpermeabilität und die Bronchokonstriktion vermitteln. Hierzu gehören neben PAF (platelet-activating factor) und Thromboxanen auch Leukotriene, deren Blockade mittels Leukotrien-Rezeptorantagonisten (z.B. Montelukast) beim Asthma bronchiale einen günstigen therapeutischen Effekt besitzt¹⁷. Zusätzlich ist der eosinophile Granulozyt über die Bildung von TGF- β und Metalloproteinasen offenbar auch an der subepithelialen Fibrosierung der Atemwege (Airway-Remodelling) beteiligt, die möglicherweise auf Schwere und Verlauf des Asthma bronchiale Einfluss hat⁷. Dabei dürfte TGF- β z.B. Myofibroblasten der Atemwege zur Bildung kollagenhaltiger Matrixproteine aktivieren, während Metalloproteinasen über die Degradation der extrazellulären Matrix in den Atemwegen die Voraussetzung für den Umbau des Gewebes schaffen¹⁶⁵.

Das bei allergischen Entzündungskrankheiten, wie z.B. dem Asthma bronchiale, von Eosinophilen dominierte entzündliche Infiltrat geht dabei neben einer verstärkten

Migration auch auf eine Aktivierung der Zellen zurück, die zu einer Verlängerung ihrer Überlebenszeit führt. Die erhöhte Viabilität beruht ihrerseits auf einer Verzögerung apoptotischer Mechanismen¹³⁸. Daher stellt die Elimination der Effektorzellen durch gezielte Induktion der Apoptose einen therapeutischen Ansatz bei chronischen entzündlichen Prozessen dar.

Die Etablierung neuer anti-entzündlicher Therapieformen ist besonders wichtig, da die gegenwärtige anti-entzündliche Therapie im Wesentlichen durch Kortikosteroide erfolgt, die z.T. erheblichen Nebenwirkungen hervorrufen.

Die Hemmung der bronchialen Akkumulation und Aktivierung der Zellen in den Atemwegen besitzt einen günstigen Einfluss auf Schwere und Verlauf der Erkrankung und steht daher im Mittelpunkt neuer anti-entzündlicher Therapieansätze. Zur Zeit sind zwei prinzipielle Wege denkbar: (1) Die Hemmung der bronchialen Gewebeeinfiltration aus dem Blut oder (2) die beschleunigte Elimination der Eosinophilen aus den Atemwegen nach der Einwanderung. Beim erstgenannten Ansatz geht es um Blockade oder Neutralisation bestimmter Zytokine und Lipidmediatoren mit chemotaktischen, chemokinetischen und aktivierenden Eigenschaften (z.B. die jetzt in Phase-II-Studien untersuchte therapeutische Wirkung von monoklonalen anti-IL-5-Antikörpern)^{77,81}. Beim zweiten Ansatz soll eine gezielte Induktion der Apoptose eine akzelerierte Elimination eosinophiler Granulozyten bewirken, wodurch spezifische Gewebeschäden vermieden werden könnten, die durch die Effektorzellen ausgelöst werden. Einen guten Mechanismus für diesen Ansatz könnte das Oberflächenantigen CD69 darstellen, das auf eosinophilen Granulozyten als Aktivierungsmarker gilt¹⁰⁸ (siehe Abschnitt 5.1).

2 ZIELE DER ARBEIT

Es finden sich zunehmend Hinweise darauf, dass der kontrollierte Zelltod durch Apoptose eine wichtige Rolle bei der Begrenzung oder gar Beendigung einer Entzündungsantwort einnimmt.

Aus den verschiedenen Modellen der chronischen Entzündung wurde für die vorliegende Arbeit die asthmatische Entzündung aus folgenden Gründen ausgewählt:

1. Asthma ist eine Volkskrankheit, ca. 6 % der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland sind betroffen. Trotz der Entwicklung neuer Medikamente sind Kortikosteroide noch immer ein unverzichtbarer Bestandteil der anti-asthmatischen Therapie.
2. Mit der segmentalen Allergenprovokation ist ein Modell verfügbar, mit dem sich die Entzündung eindeutig definieren lässt.
3. Bei der allergischen Entzündung ist der eosinophile Granulozyt die dominierende Effektorzelle.
4. Über die Apoptose eosinophiler Granulozyten ist bislang nur wenig bekannt, und das Thema wird kontrovers diskutiert.

Die Akkumulation eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen von Asthmatikern dürfte sowohl auf eine gesteigerte Zellinfiltration als auch auf ein verlängertes Überleben der Entzündungszelle durch eine verzögerte Apoptoseinduktion zurückgehen¹³⁷. Zytokine, einschließlich der Interleukine (IL)-3, IL-5 und des „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“ (GM-CSF), antagonisieren den apoptotischen Zelltod eosinophiler Granulozyten. Die Expression dieser Zytokine ist bei allergischen Erkrankungen erhöht^{61,162}.

Die der Apoptose zugrunde liegenden Mechanismen im Rahmen der chronischen eosinophilen Atemwegsentzündung beim Asthma sind jedoch noch nicht bekannt. Aufgrund der Bedeutung der Apoptose für die Kontrolle der chronischen Entzündung verspricht die Kenntnis der hierbei operierenden Mechanismen jedoch ein ganz neues Verständnis der inflammatorischen Prozesse. Darüber hinaus eröffnet sie möglicherweise einen alternativen anti-entzündlichen Behandlungsansatz für das

Asthma bronchiale. Diese Arbeit verfolgte deshalb das Ziel, den funktionellen Effekt der CD69-Rezeptor-Aggregation auf humanen eosinophilen Granulozyten in Hinsicht auf zelluläre und subzelluläre Änderungen im Zusammenhang mit der Apoptose zu analysieren. Zusätzlich sollten diese Ergebnisse mit den CD95-bedingten Änderungen verglichen werden.

Um die funktionelle Bedeutung des CD69-Antigens für eosinophile Granulozyten genauer zu untersuchen, sollte der Effekt der CD69- bzw. CD95-Ligation auf Überleben und Apoptose humaner Eosinophiler aus dem peripheren Blut beschrieben werden. Neben der Wirkung von MMP-9 auf den Phänotyp sollte auch geprüft werden, ob die Protease die Viabilität eosinophiler Granulozyten beeinflusst.

Die Expression von *bcl-2* führt zur Unterdrückung des Apoptoseprozesses in verschiedenen Zelltypen. Dessen Rolle in eosinophilen Granulozyten wird bisher kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt die Bedeutung von *bcl-2* beim eosinophilen Granulozyten sowohl bei der CD69- als auch bei der CD95-assoziierten Apoptose analysiert werden. Neben *bcl-2* sollte auch die Beteiligung anderer Proteine aus derselben Protein-Familie wie *bcl-x_L*, *bcl-x_S* und *bax* an der CD69-vermittelten Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten untersucht werden.

Caspasen gelten als Initiator- und Effektormoleküle bei der apoptotischen Signalvermittlung der Zelle. Sie kommen in allen Zelltypen vor. Ihre Rolle in eosinophilen Granulozyten ist jedoch noch nicht im Detail geklärt. Um zu analysieren, ob und in welcher Form die Caspasen-Kaskade am Engagement der CD69-, CD95- und CD11b-Rezeptoren beteiligt ist, sollte schließlich die Bedeutung verschiedener Caspase-Inhibitoren auf die Viabilität humaner eosinophiler Granulozyten analysiert werden.

Ferner sollte an einem humanen Modell der allergischen Entzündung, der segmentalen Allergenprovokation (SAP), die Rolle des eosinophilen Granulozyten sowie sein Phänotyp in Bezug auf die apoptoserelevanten Antigene CD69 und CD95 und dem hier als Kontrollantigen verwendeten CD11b *in vivo* untersucht werden. Danach sollten vergleichende Experimente zur *in vitro*-Expression dieser Antigene

durchgeführt werden. Da die Matrix-Metalloproteinase MMP-9 beim Asthma eine bedeutende Rolle spielt, sollte ihr Einfluss auf den Phänotyp eosinophiler Granulozyten analysiert werden.

Mit der Etablierung und dem besseren Verständnis der CD69-induzierten Apoptose eosinophiler Granulozyten hat die Arbeit die Therapie des Asthma bronchiale und anderer mit Eosinophilen assoziierter Erkrankungen im Blick, die durch Apoptose-Induktion mittels monoklonaler Antikörper möglich wäre.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| | |
|--------------------------------------|--|
| Analysenwaage BP 610 | Sartorius, Göttingen, D |
| FACSCalibur | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Geldetektionssystem | Biostep, Jahnsdorf, D |
| Gelelektrophoresekammer | Bio-Rad, München, D |
| Inverses Mikroskop Axiovert 25 | Carl Zeiss, Jena, D |
| Kochplatte mit Magnetrührer MR 3001 | Heidolph, Schwabach, D |
| Laser Scanning Mikroskop LSM 510 | Carl Zeiss, Jena, D |
| Labofuge 400R | Heraeus, Hanau, D |
| Mikroplatten-Washer | Tecan, Crailsheim, D |
| Mikroskop Axiolab | Carl Zeiss, Jena, D |
| Olympus BF 1T20D Endoskop | Olympus, Hamburg, D |
| pH-Meter pH526 | WTW, Weilheim, D |
| Präzisionswaage BP 61 | Sartorius, Göttingen, D |
| Robo-Cycler Gradient 96 | Stratagene, Amsterdam, NL |
| Schüttelwasserbad 1083 | GFL, Burgwedel, D |
| Steri-Cult 200 Inkubator | Forma Scientific, Frankfurt, D |
| Sterilbank Hera Safe | Haereus, Hanau, D |
| Tischzentrifuge Rotanta 96 RS | Hettich, Tuttlingen, D |
| Tischzentrifuge EBA 12 | Hettich, Tuttlingen, D |
| Tischzentrifuge EBA 12 R | Hettich, Tuttlingen, D |
| Universal Mikroplatten-Reader EL 800 | Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall, D |
| Vakusafe-Absaugsystem | Integra Biosciences, Fernwald, D |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA |
| Zytozentrifuge Cytospin 3 | Shandon, Berlin, D |

3.1.2 Software

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| DAO Software für LSM-Auswertung | Carl Zeiss, Jena, D |
| FACS-Software CellQuest Pro | Becton Dickinson, Heidelberg, D |

| | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Phoretix Grabber-Software v3.01 | Biostep, Jahnsdorf, D |
| Phoretix 1D Advanced v4.00 Software | Biostep, Jahnsdorf, D |
| SPSS 10.0.7 für Windows | SPSS, München, D |

3.1.3 Materialien für die Reinigung der eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut

| | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| CD16 MicroBeads | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D |
| EDTA-Monovette, 9 ml | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| D(+)-Glucose | Sigma-Aldrich, München, D |
| KCl | Sigma-Aldrich, München, D |
| Light Green SF Yellowish | Fluka Chemika, Buchs, CH |
| NaCl | Sigma-Aldrich, München, D |
| Neubauer-Zählkammer | Roth, Karlsruhe, D |
| Percoll-Lösung (Dichte 1,130 g/ml) | Amersham Biosciences, Freiburg, D |
| Pipes | Sigma-Aldrich, München, D |
| Saponin | Sigma-Aldrich, München, D |
| Toluidinblau | Fluka Chemika, Buchs, CH |
| Trenn-Säule, Größe CS | Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D |

3.1.4 Medien, Stimulantien und Inhibitoren für die Zellkultur

| | |
|--|--------------------------------|
| Dulbecco's PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ | CellConcept, Umkirch, D |
| RPMI 1640/10 % FCS | CellConcept, Umkirch, D |
| L-Glutamin | Seromed, Berlin, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| FCS | Gibco BRL, Karlsruhe, D |
| GM-CSF | CellConcept, Umkirch, D |
| IFN- γ | CellConcept, Umkirch, D |
| Maus-anti-Human-CD11b-mAk (Klon Bear-1) | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Maus-anti-Human-CD69-mAk (Klon Tp1/55) | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Maus-anti-Human-CD95-mAk (Klon CH-11) | Beckman Coulter, Krefeld, D |

| | |
|--|----------------------------------|
| Maus-anti-Human-CD95-mAk (Klon ZB4, Apoptose-inhibierend) | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Wortmannin (PI3-Kinase-Inhibitor) | Alexis Biochemicals, Grünberg, D |
| LY-294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) | Alexis Biochemicals, Grünberg, D |
| rekombinante MMP-9 | R&D-Systems, Wiesbaden, D |
| allgemeiner Caspaseinhibitor Z-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon (Z-VAD-FMK) | Calbiochem, Schwalbach, D |
| Inhibitor für Caspase 3 Z-Asp-Glu-Val-Asp-Fluoromethylketon (Z-DEVD-FMK) | Calbiochem, Schwalbach, D |
| Inhibitor für Caspase 8 Z-Ile-Glu-Thr-Asp-Fluoromethylketon (Z-IETD-FMK) | Calbiochem, Schwalbach, D |
| Inhibitor für Caspase 9 Z-Leu-Glu-His-Asp-Fluoromethylketon (Z-LEHD-FMK) | Calbiochem, Schwalbach, D |

3.1.5 Antikörper und Reagenzien für die durchflusszytometrische Analyse

| | |
|--|------------------------------|
| FITC-konjugierter anti- <i>bcl-2</i> -mAk (Klon 124) | Dako, Hamburg, D |
| FITC-konjugierter anti-CD11b-mAk (Klon Bear 1) | Beckman-Coulter, Krefled, D |
| FITC-konjugierter anti-CD16-mAk (Klon 3G8) | Caltag, Hamburg, D |
| PE-Cy5-konjugierter anti-CD16-mAk (Klon 3G8) | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| PE-konjugierter anti-CD69-mAk (Klon FN50) | BD Pharmingen, Heidelberg, D |
| PE-konjugierter anti-CD95-mAk (Klon DX2) | BD Pharmingen, Heidelberg, D |
| FITC-konjugierte Isotyp-Kontrolle IgG1 | Dako Cytomation, Hamburg, D |
| PE-konjugierte Isotyp-Kontrolle IgG1 | Dako Cytomation, Hamburg, D |
| Propidiumiodid | Sigma-Aldrich, München, D |
| p-Benzochinon | Sigma-Aldrich, München, D |
| n-octyl- β -D-Glukopyranosid | Sigma-Aldrich, München, D |

3.1.6 Reagenzien für die Molekularbiologie

3.1.6.1 Reagenzien und Materialien für die RT-PCR

| | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| High-Pure RNA-Isolation-Kit | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| First-Strand-Synthesis-Kit | Stratagene, Amsterdam, NL |

| | |
|---|---------------------------------------|
| Ethidiumbromid | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| dNTPs | Amersham Biosciences, Freiburg, D |
| Taq Polymerase | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| Agarose LE | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| Multiplex-PCR-Kit (Primer-Cocktail für GAPDH, Caspase-3, <i>bcl-2</i> , <i>bcl-x_L</i> und <i>bax</i>) | Maxim-Biotech, San Francisco, CA, USA |

PCR-Primer für CD69:

| | |
|------------------------|----------------------|
| Spezifischer F-Primer: | TCCTGTCCTTGAACCTTCCT |
| Spezifischer R-Primer: | CGAACAAGACTTGTACCACG |

Die Primer wurden von der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden hergestellt. Die Größe des PCR-Produktes betrug 262 bp.

3.1.6.2 Reagenzien für den Chromatin-Fragmentations-Assay

| | |
|-----------------|---------------------------|
| Brom-Phenolblau | Sigma-Aldrich, München, D |
| Chloroform | Sigma-Aldrich, München, D |
| EDTA | Sigma-Aldrich, München, D |
| Ethanol | Sigma-Aldrich, München, D |
| Glyzerin | Sigma-Aldrich, München, D |
| NaOH | Sigma-Aldrich, München, D |
| Phenol | Sigma-Aldrich, München, D |
| Proteinase K | Sigma-Aldrich, München, D |
| RNase A | Sigma-Aldrich, München, D |
| SDS | Sigma-Aldrich, München, D |
| Tris-HCl | Sigma-Aldrich, München, D |
| Xylen-Cyanol | Sigma-Aldrich, München, D |

3.1.7 Reagenzien für die konfokale Immunofluoreszenz-Mikroskopie

| | |
|---|------------------------------|
| 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine-5,5'-disulfonic acid (DiIC ₁₈ (3)-DS) | Molecular Probes, Leiden, NL |
| 4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI, dilactate) | Molecular Probes, Leiden, NL |
| Prolong Antifade | Molecular Probes, Leiden, NL |

3.1.8 Materialien für die segmentale Atemwegsprovokation und Aufarbeitung der bronchoalveolären Lavagen

| | |
|---|----------------------------|
| CAP System zur IgE-Bestimmung | Kabi Pharmacia, Uppsala, S |
| <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> -Allergen | Allergopharma, Reinbek, D |
| Graspollen-Allergen | Allergopharma, Reinbek, D |
| Jet Nebulizer | Pari, Starnberg, D |
| Katzenhaar-Allergen | Allergopharma, Reinbek, D |
| Centriprep (MW Cut-off 3.000 kDa) | Millipore, Schwalbach, D |
| Lokalanästhetikum Novesine | Wander Pharma, Bern, CH |
| May-Gruenwald-Giemsa-Färbung | Sigma-Aldrich, München, D |

3.1.9 ELISA-Kit

| | |
|-----------------|---------------------------|
| MMP-9 ELISA Kit | R&D-Systems, Wiesbaden, D |
|-----------------|---------------------------|

3.1.10 Puffer und Lösungen

Heavy Percoll Solution:

500 ml Percoll (Dichte 1,130 g/ml, pH 9,0)

45 ml 10 x Pipes-Puffer, bestehend aus 25 mM Pipes, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 40 mM NaOH und 5,4 mM Glucose

12 ml Aqua bidest.

Light Percoll Solution:

50 ml Heavy Percoll Solution

45 ml 10 x Pipes-Puffer

405 ml Aqua bidest.

Der pH wurde in beiden Lösungen mit HCl auf einen Wert von 7,4 eingestellt und die Lösungen steril filtriert. Die zur Zellseparation verwendete Dichtestufe von 1,080 g/ml wurde durch Mischen von 11,5 ml Heavy Percoll Solution mit 8,5 ml Light Percoll Solution hergestellt.

1 x Tris/EDTA (TE)-Puffer:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

Die Lösung wurde mit HCl auf einen pH von 8,0 eingestellt.

3.2 Reinigung der eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut

Eosinophile wurden aus dem peripheren Blut (90 ml in EDTA) leichter Asthmatiker mit einer Modifikation einer bereits beschriebenen Methode isoliert⁵⁶. Zusammengefasst: Gesamtblut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und Aliquots von 25 ml wurden auf 20 ml isotonischer Percoll-Lösung (Dichte 1.080 g/ml) in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen überschichtet und für 30 min bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand und die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) in der Zwischenschicht wurden verworfen und das Präzipitat mit den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten weiterbearbeitet. Verunreinigende Erythrozyten wurden mittels hypotonischer NaCl-Lyse entfernt. Die Granulozyten wurden zweimal in PBS mit 2 % FCS gewaschen. Die Reinigung der Eosinophilen erfolgte durch negative Selektion mittels anti-CD16-gekoppelten magnetischen Mikropartikeln. CD16-Mikrobeads (5 µl pro 1×10^7 Neutrophile) wurden in die Zellsuspension gegeben und für 30 min bei 4°C unter konstantem Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mittels einer Säule getrennt. Die Eosinophilen wurden aus dem magnetischen Feld mit 40 ml eiskaltem PBS/2 % FCS eluiert. Nach Zentrifugation wurde das negativ-selektierte Pellet mit den Eosinophilen in 1 ml PBS/2 % FCS resuspendiert. Die Reinheit der Eosinophilen-Präparationen betrug ≥ 99 % mit einigen verunreinigenden mononukleären Zellen und Neutrophilen, die mit differenzieller Auszählung bestimmt wurden (200 Zellen, Kimura-Färbung). Die Viabilität der Eosinophilen betrug nach Bestimmung mit Propidiumiodid in allen Präparationen $> 97\%$.

3.3 Zellkultur

Die Eosinophilen (5×10^5 Zellen/ml) wurden in RPMI-1640, das mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

ergänzt wurde, bei 37°C in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ entweder allein oder in Gegenwart von GM-CSF bzw. IFN-γ (jeweils 10 µg/ml) mit oder ohne anti-CD69-mAk (Klon TP1.55.3, 10 µg/ml) bzw. anti-CD95-mAk (Klon CH-11, 1 µg/ml) oder als Kontrolle anti-CD11b-mAk (Klon Bear-1, 10 µg/ml) inkubiert.

3.3.1 Bestimmung des Effekts von MMP-9 auf die Oberflächenexpression und die Viabilität

Eosinophile aus humanem Vollblut wurden mittels Dichtegradient und negativer magnetischer Zellseparation (MACS) isoliert, mit GM-CSF (10 ng/ml) und in Kombination mit anti-CD69-mAk (Klon TP1/55, 10 µg/ml) bzw. anti-CD95-mAk (Klon CH-11, 1 µg/ml) inkubiert. Zusätzlich wurde mit rekombinanter humaner MMP-9 (0,1 µg/ml) inkubiert. Die Oberflächenexpression (Abschnitt 3.4) und die Viabilität mittels Propidiumiodid wurden durchflusszytometrisch gemessen (Abschnitt 3.6).

3.3.2 Bestimmung der Caspasen-Abhängigkeit

Eosinophile aus humanem Vollblut wurden mittels Dichtegradient und negativer magnetischer Zellseparation (MACS) isoliert, mit GM-CSF (10 ng/ml) und in Kombination mit anti-CD69-mAk (Klon TP1/55, 10 µg/ml) bzw. anti-CD95-mAk (Klon CH-11, 1 µg/ml) inkubiert. Als allgemeiner Caspaseinhibitor wurde Z-VAD-FMK eingesetzt, als Inhibitor für Caspase-3 Z-DEVD-FMK, für Caspase-8 Z-IETD-FMK und für Caspase-9 Z-LEHD-FMK (jeweils 20 µM). Alle eingesetzten Caspase-Inhibitoren sind zellmembranpermeabel. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid durchflusszytometrisch gemessen (Abschnitt 3.6).

3.3.3 Bestimmung der PI3K-Abhängigkeit

Eosinophile aus humanem Vollblut wurden mittels Dichtegradient und negativer magnetischer Zellseparation (MACS) isoliert, mit GM-CSF (10 ng/ml) und in Kombination mit anti-CD69-mAk (Klon TP1/55, 10 µg/ml) bzw. anti-CD95-mAk (Klon CH-11, 1 µg/ml) inkubiert. Als PI3K-Inhibitoren wurden Wortmannin (25 µM)

und LY-294002 (1 μ M) eingesetzt. Beide Inhibitoren sind zellmembranpermeabel. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid durchflusszytometrisch gemessen (Abschnitt 3.6).

3.3.4 Bestimmung der CD95-Abhängigkeit der CD69-induzierten Apoptose

Eosinophile aus humanem Vollblut wurden mittels Dichtegradient und negativer magnetischer Zellseparation (MACS) isoliert, mit GM-CSF (10 ng/ml) und in Kombination mit anti-CD69-mAk (Klon TP1/55, 10 μ g/ml) bzw. anti-CD95-mAk (Klon CH-11, 1 μ g/ml) inkubiert. Als Inhibitor wurde ein Maus-anti-Human-CD95-mAk (Klon ZB4, 1 μ g/ml) eingesetzt, der die CD95-induzierte Apoptose inhibiert. Die Viabilität wurde mittels Propidiumiodid durchflusszytometrisch gemessen (Abschnitt 3.6).

3.4 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung ist es möglich, Zellpopulationen hinsichtlich mehrerer physikalischer Eigenschaften der beteiligten Einzelzellen zu analysieren. Dies erlaubt eine exakte Unterscheidung sowie Phänotypisierung der Zellen. Die Durchflusszytometrie liefert für jede Zelle Informationen bezüglich Größe, Granularität sowie Fluoreszenzintensität von Fluoreszenzfarbstoffen, mit denen die Zelle markiert wurde. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind an monoklonale Antikörper, die gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene oder gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind, gebunden. Es können ebenso die Zellmembran oder die DNA direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die so markierten Zellen werden im Durchflusszytometer in einer dünnen Kapillare angesaugt, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht, der mit einem Laserlicht z.B. der Wellenlänge von 488 nm in Kontakt tritt. Über Photodetektoren erfolgt die Messung des Vorwärtstreulichtes als Maß für die Zellgröße und des Seitwärtstreulichtes als Maß für die Granularität sowie die Erfassung der emittierten Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. FITC, PE, PE-Cy5, Propidiumiodid), die ein Korrelat der zellulären Bindungsstellen des entsprechenden Oberflächenantigens darstellt. Nach dem Messvorgang können die gespeicherten Daten mit einer speziellen FACS-

Software ausgewertet werden.

Mit dem verwendeten Durchflusszytometer war die Messung folgender Fluoreszenzen möglich: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert grünes Licht der Wellenlänge 519 nm, Phycoerythrin (PE) gelbrotes Licht von 578 nm und Propidiumiodid und PE-Cytochrom 5 (Cy5) rotes Licht von 617 nm bzw. 667 nm.

Die Expression von CD11b, CD69 bzw. CD95 auf Eosinophilen wurde mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern wie kürzlich beschrieben¹⁰⁰ analysiert. Hierzu wurden die Eosinophilen in RPMI-1640 resuspendiert und 20 µl (5×10^4 Zellen) mit FITC-konjugiertem anti-CD11b-mAk (Klon Bear-1), PE-konjugiertem anti-CD69-mAk (Klon FN50) bzw. PE-konjugiertem anti-CD95-mAk (Klon DX2) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS/2 % FCS gewaschen, in 200 µl Propidiumiodid-Lösung (0,5 µg/ml in PBS) resuspendiert und durchflusszytometrisch mit mindestens 2.000 Zellen von jedem Ansatz mit einem FACSCalibur gemessen. Die Analyse erfolgte mittels CellQuest-Software. Nicht-viable Zellen wurden durch entsprechendes „Gating“ aus der Analyse ausgeschlossen. Die unspezifische Fluoreszenz wurde durch Inkubation mit Isotyp-spezifischen Antikörpern (FITC- bzw. PE-konjugiertes IgG1) kontrolliert. Alle fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt (10 µl/Test). Die spezifische mittlere Fluoreszenz (SMF) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Fluoreszenz von der mittleren Fluoreszenz des spezifischen Antikörpers bestimmt¹⁰⁰. CD11b wurde als Kontrollantigen gewählt, da es ebenfalls wie CD69 nach Aktivierung hochreguliert wird, und spielt eine Rolle bei der Degranulation^{62,163}.

Die Analyse der BAL-Eosinophilen wurde an resuspendierten Gesamt-BAL-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem anti-CD11b-mAk, PE-konjugiertem anti-CD69-mAk bzw. PE-konjugiertem anti-CD95-mAk und zusätzlich mit anti-CD16-mAk, entweder FITC- oder PE-Cy5-markiert, für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Oberflächen-Antigen-Expression der Eosinophilen wurde durch entsprechendes „Gating“ ausgewertet.

3.5 Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Proteine

Die durchflusszytometrische Analyse von intrazellulärem *bcl-2* wurde, wie bereits beschrieben ⁸⁹, durchgeführt. Hierzu wurden nach der entsprechenden Inkubation je 5×10^4 gereinigte Eosinophile in 200 μ l 0,4 % p-Benzochinon für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Durch Fixierung mit p-Benzochinon wird eine unspezifische FITC-Bindung an die Zellen minimiert ⁸⁹. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und in 100 μ l 6 mg/ml n-octyl- β -D-Glucopyranosid für 6 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit direkt-konjugiertem *bcl-2*-FITC-mAk (Klon 124, 10 μ l/Test) für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und nach abschließendem Waschen in 200 μ l PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der *bcl-2*-Proteinexpression wurden mindestens 5.000 Zellen mit einem FACSCalibur analysiert.

3.6 Zell-Viabilitäts-Assay

Die Überlebensfähigkeit der Eosinophilen in Kultur wurde mittels Propidiumiodid bestimmt. Propidiumiodid ist ein nicht-membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, der mit der DNA interkaliert, und daher nur Zellen anfärben kann, deren Zellmembran geschädigt ist, wie dies bei toten Zellen oder Zellen in einer späten Phase der Apoptose der Fall ist.

1×10^5 Zellen wurden einmal in PBS/2 % FCS gewaschen und in 200 μ l einer Propidiumiodid-Lösung (0,5 μ g/ml, gelöst in PBS) resuspendiert. Der relative Anteil viabler zu nicht-viablen Zellen wurde durchflusszytometrisch an mindestens 5.000 Zellen pro Stimulationsansatz gemessen.

3.7 Nachweis der mRNA-Expression

Für die mRNA-Expression wurde pro Stimulationsansatz Gesamt-RNA von 10^6 eosinophilen Granulozyten jeweils nach Angaben des Herstellers mit dem High-Pure RNA-Isolation-Kit von Roche Diagnostics isoliert und mit dem First-Strand-Synthesis-Kit von Stratagene in cDNA umgeschrieben.

Für den Nachweis der CD69-mRNA wurde die PCR-Amplifikation in einem Gesamtvolumen von 25 µl (5 U Taq Polymerase, 20 µM von jedem Primer, 20 nM dNTPs) ausgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit 35 Zyklen, die Bindungstemperatur betrug 60°C, die Kettenverlängerung fand bei 72°C und die Denaturierung bei 94°C statt.

Die PCR zum Nachweis von GAPDH, Caspase-3, *bcl-2*, *bcl-x_L* und *bax* erfolgte mit einem Multiplex-PCR-Kit mit einem Primer-Cocktail nach den Angaben des Herstellers.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung wurden die Gele unter UV-Licht mittels Phoretix Grabber-Software in einem Detektionssystem aufgenommen und densitometrisch mit Hilfe der Phoretix 1D Advanced v4.00-Software ausgewertet.

3.8 Konfokale Immunofluoreszenzmikroskopie

Zur Membranfärbung wurden 1×10^5 Zellen mit 2 µM „1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine-5,5'-disulfonic acid“ (DiIC₁₈(3)-DS) für 5 min bei 37°C und anschließend für 15 min bei 4°C inkubiert. Zur anschließenden Oberflächenbestimmung von CD69 wurden die Zellen mit PE-konjugiertem anti-CD69-mAk (Klon FN50, 10 µl/Färbung) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung der Kerne wurde durch Inkubation mit 300 nM „4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate“ (DAPI, dilactate) für 5 min bei Raumtemperatur erreicht. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in „Prolong™ Antifade“ resuspendiert und auf Objektträger aufgetragen. Die Mikroskopie wurde an einem LSM 510 ausgeführt.

3.9 Chromatin-Fragmentations-Assay

Ein Kennzeichen der Apoptose ist die internukleosomale Fragmentation der chromosomalen DNA in Stücke mit einer Länge von ca. 180-200 bp bzw. einem Vielfachen davon, die in der Elektrophorese als „DNA-Leiter“ erkennbar werden. Die

DNA-Isolation erfolgte nach einer modifizierten, bereits beschriebenen Methode⁶¹. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen zweimal gewaschen und in 100 µl Puffer mit 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0, 0,5 % SDS und 0,5 mg/ml Proteinase-K lysiert. Nach Zentrifugation bei 3.000 g für 5 min wurde der Überstand für 1 h bei 50°C inkubiert. 20 µl RNase-A (Endkonzentration 100 µg/ml) wurde dazugegeben, worauf eine weitere Inkubation für 1 h bei 50°C folgte. Dann wurden 300 µl einer gesättigten Phenol/Chloroform-Lösung zugegeben. Nach 2 min Mischen wurde die Lösung bei 14.000 g für 2 min zentrifugiert. Die obere Phase, die die DNA enthielt, wurde abgenommen, mit 300 µl 0,2 M NaOH in 70 % Ethanol ergänzt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 g für 15 min und Abnehmen des Überstandes wurde die DNA bei 37°C getrocknet und das Pellet in 15 µl TE-Puffer suspendiert. Ein Aliquot von 5 µl wurde mit 0,1 Volumen eines 10x Probenpuffers (0,42 % Bromo-Phenolblau, 0,42 % Xylen-Cyanol, 50 % Glyzerin) vermischt und für 1 h elektrophoretisch aufgetrennt (1,9 % Agarose, 100 Volt). Zur Aufzeichnung wurde das Gel in 0,001 % Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

3.10 Probanden für die segmentale Allergenprovokation

Elf Personen mit leichtem bis mittlerem allergischen Asthma, sechs Männer und fünf Frauen, Durchschnittsalter $23,3 \pm 0,7$ Jahre (Bereich: 20 bis 28 Jahre), mit einer Mindestdauer des Asthmas von mehr als 2 Jahren wurden untersucht. Alle Patienten hatten eine Anamnese von periodischem Giemen, thorakalem Engegefühl, Husten und Sputumproduktion entweder spontan oder anstrengungsinduziert, sowie bronchiale Hyperreagibilität, die mit Hilfe eines abgeänderten Bronchoprovokationstestes mit Carbachol, wie an anderer Stelle beschrieben¹, bestimmt wurde. Alle Patienten wurden vor der Provokation von einem unabhängigen Arzt als Asthmatiker eingehend klinisch untersucht und die Diagnose nach den Kriterien der Deutschen Atemwegsliga festgestellt. Jeder Patient hatte einen positiven Skin-Prick-Test entweder für Graspollen- (n=7), Katzenhaare- (n=2) oder *Dermatophagoides pteronyssinus*-(Hausstaubmilbe) Extrakte (n=2) und erhöhte spezifische IgE-Werte ($>3,5$ kU/l) für das jeweilige Allergen sowie eine reversible Bronchokonstriktion nach Inhalation der Allergene. Vor der segmentalen Allergenprovokation (SAP) wurde bei den Probanden eine inhalative

Allergenprovokation, wie beschrieben ¹⁶¹, durchgeführt, um die Allergenkonzentration zu bestimmen, die einen 20 %igen Abfall der FEV₁ (PD₂₀) für das jeweilige Allergen hervorruft. Die segmental instillierte Dosis betrug das 10-fache der individuellen PD₂₀.

Bei keinem der Probanden gab es Hinweise auf einen Atemwegsinfekt vor bzw. während des Zeitraums der segmentalen Allergenprovokation. Alle Probanden waren Nichtraucher. Die basale Lungenfunktion, als FEV₁ in % vom Soll gemessen, betrug $100,35 \pm 4,84$ (Mittelwert \pm SEM). Die Patienten erhielten in den 14 Tagen vor SAP eine Therapie mit inhalativen β 2-Agonisten auf Bedarfsbasis. Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung, nachdem die Studie von der Ethikkommission der Universität Jena genehmigt worden war.

3.11 Segmentale Atemwegsprovokation und bronchoalveoläre Lavage

Die Bronchoskopie wurde wie bereits beschrieben durchgeführt ¹⁶². 30 min vor der Prozedur erhielten die Patienten 0,5 mg Atropin und 12,5 mg Codein i.m. Ein Lokalanästhetikum (Novesine) wurde mittels Jet-Nebulizer für 20 min inhaliert. Die Bronchoskopie wurde mit einem Olympus BF 1T20D über die Nase durchgeführt. Kochsalzlösung (2,5 ml) wurde in den unteren lingulären Bronchus (B5 links) instilliert. Dann wurden 0,3 bis 400 Protein-Stickstoff-Einheiten (PNU) von entweder Graspollen-, Katzenhaar- oder *D. pteronyssinus*-Allergen in 2,5 ml Kochsalzlösung in das mittlere basale Segment des rechten unteren Lappens (B7 rechts) und in das mittlere Segment des rechten Mittellappens (B5 rechts) instilliert. Der Bronchus des rechten unteren Lappens wurde mit 100 ml vorgewärmter Kochsalzlösung 10 min nach der Allergeninstillation lavagiert. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde durch Instillation von 20 ml Aliquots durchgeführt, die anschließend wieder vorsichtig aspiriert und auf 4°C gekühlt wurden.

Nach 18 h wurde die Bronchoskopie wiederholt und der linke Lingula-Bronchus, in den während der ersten Bronchoskopie 2,5 ml Kochsalzlösung instilliert wurden, mit 100 ml vorgewärmter Kochsalzlösung lavagiert. Anschließend wurde das mittlere Segment des Bronchus des Mittellappens mit 100 ml Kochsalzlösung mit der

gleichen Technik wie oben beschrieben lavagiert.

Die BAL-Proben wurden zuerst durch zweilagige Gaze filtriert und die Zellen wurden dann bei 500 g für 10 min abzentrifugiert. Die Bestimmung der gesamten kernhaltigen Zellen wurde mittels Kimurafärbung (0,05 % Toluidin-Blau; 0,03 % Licht-Grün; 0,066 M PBS pH 6,4; 0,3 % Saponin) und Auszählen in einer Neubauer-Kammer durchgeführt. Die Zytologie der Zellen aus der BAL-Flüssigkeit wurde nach Zytozentrifugation und May-Gruenwald-Giemsa-Färbung vorgenommen. Der relative Anteil der verschiedenen Leukozytensubpopulationen wurde aus einer Differenzialzählung von 500 Zellen ermittelt.

3.12 Bestimmung der MMP-9-Expression in der BAL-Flüssigkeit per ELISA

Für die Bestimmung der MMP-9 in der BAL-Flüssigkeit wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA-Kit verwendet. Die Analyse erfolgte nach den Empfehlungen der Hersteller. Die BAL-Flüssigkeit wurde dazu 10-fach konzentriert.

3.13 Statistische Analyse

Falls nicht anders angegeben, wurden die Daten in Text und Abbildungen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgedrückt. Alle Daten wurden nicht-parametrisch mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test für zwei verbundene Stichproben oder Mann-Whitney U-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Variablen mit einer Statistik-Software verglichen (SPSS 10.0.7 für Windows). Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 *In vitro*-Protein-Expression von CD69 auf eosinophilen Granulozyten

Um die Expression von CD69 besser zu verstehen, wurden zunächst die zugrunde liegenden Mechanismen anhand verschiedener *in vitro*-Ansätze untersucht und mit dem Todesrezeptor CD95 und dem Kontrollantigen CD11b verglichen.

Die Analyse von humanen Blut-Eosinophilen nach 18 h Kultur mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte keine Expression von CD69 auf der Oberfläche (Abbildung 4.1A I und II). Inkubation mit GM-CSF über den gleichen Zeitraum führte jedoch zu einer deutlichen Expression des Zellantigens (Abbildung 4.1A III und IV). Die durchflusszytometrische Analyse bestätigt die mittels Immunfluoreszenz nachzuweisende Zunahme der CD69-Expressionsdichte (Abbildung 4.1B).

Als nächstes wurde die Kinetik der Expression von CD69, CD95 und CD11b untersucht. Die Oberflächenantigene wurden auf gereinigten humanen Eosinophilen aus dem Blut durchflusszytometrisch nach 0 h, 18 h, 42 h und 66 h Inkubation analysiert. Nicht-stimulierte Eosinophile, die ausschließlich in Medium inkubiert wurden, exprimierten zu keinem Zeitpunkt das CD69-Antigen. So wiesen beispielsweise gereinigte Eosinophile von fünf verschiedenen atopischen Spendern eine SMF der CD69-Expression von $0,30 \pm 0,42$ auf (Abbildung 4.2A), die sich nach Inkubation über 66 h im Kontrollmedium nicht signifikant änderte. In Gegenwart von GM-CSF oder IFN- γ (jeweils 10 ng/ml) ließ sich jedoch eine zeitabhängige kontinuierliche Expressionszunahme von CD69 bis über den Beobachtungszeitraum von 66 h beobachten (Abbildung 4.2A), die für GM-CSF deutlicher ausfiel als für IFN- γ . Die CD69-Expression durch GM-CSF ließ sich bereits nach 18 h erkennen, während die IFN- γ -induzierte Antigenexpression erst nach 42 h zu identifizieren war (Abbildung 4.2A). Ein Expressionsmaximum war für beide Zytokine nach 66 h noch nicht erreicht.

Im Vergleich zu CD69 lag die CD95-Expression von Kontroll-Eosinophilen auf einem höheren Niveau (Abbildung 4.2B). In Gegenwart nur von Medium (Kontrolle) änderte sich die Expressionsdichte des Oberflächenantigens über die Inkubationsperiode von 66 h nicht. Auch bei Inkubation mit GM-CSF (10 ng/ml) zusätzlich war keine

Expressionsänderung, verglichen mit dem Ausgangswert, erkennbar (Abbildung 4.2B). Im Gegensatz dazu, erhöhte IFN- γ die CD95-Expression zeitabhängig mit einem maximalen Effekt bei 42 h, während sie danach wieder abnahm (Abbildung 4.2B).

Im Unterschied zu CD69 und CD95 wurde die maximale CD11b-Expression nicht-stimulierter Eosinophiler direkt nach Reinigung der Zellen beobachtet. Sie nahm im weiteren Verlauf auf den Kontrollzellen ohne Zytokinstimulation über die Inkubationsdauer von 66 h kontinuierlich ab (Abbildung 4.2C). Auch in Gegenwart von IFN- γ reduzierte sich die CD11b-Expression über 42 h und blieb anschließend konstant über dem Niveau der Kontrollzellen. Die Stimulation mit GM-CSF verhinderte die Abnahme der Expressionsdichte von CD11b zu allen Zeitpunkten (Abbildung 4.2C).

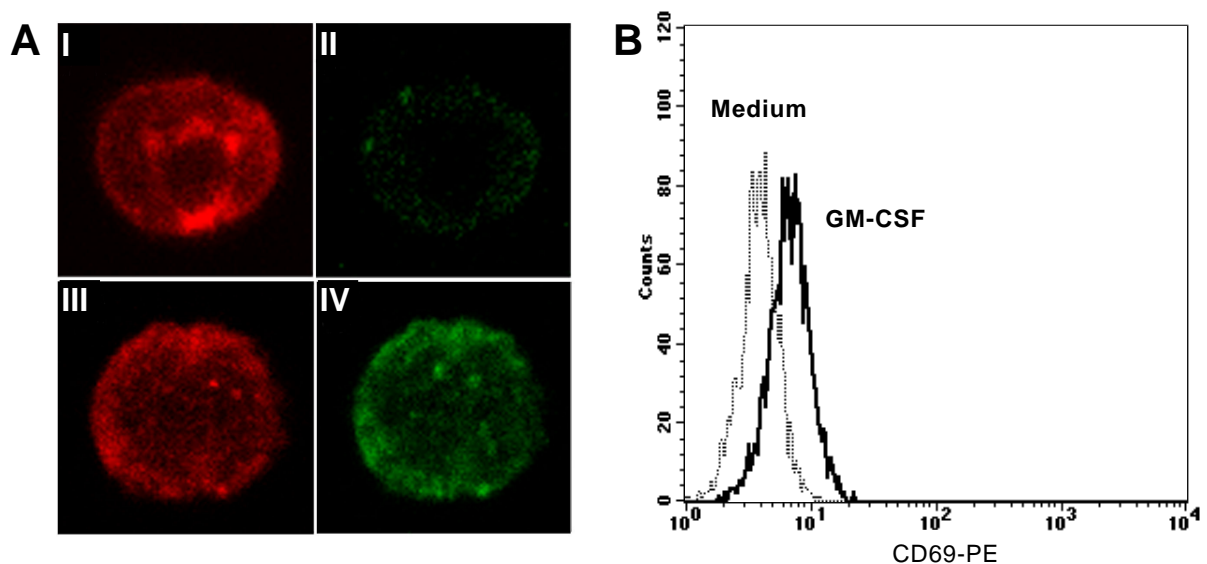


Abbildung 4.1: Immunfluoreszenzzytologischer Nachweis des CD69-Antigens auf humanen eosinophilen Granulozyten nach Inkubation mit GM-CSF. **A:** Humane eosinophile Granulozyten aus dem Blut wurden für 18 h entweder nur in Medium (I, II) oder zusätzlich mit GM-CSF (10 ng/ml) (III, IV) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. In I und III ist die Zellmembran mittels DiI18(5)-DS dargestellt, in II und IV CD69 mittels spezifischen PE-markierten Antikörpers. Nur GM-CSF-stimulierte Zellen exprimierten CD69 auf ihrer Oberfläche. **B:** Eosinophile Granulozyten wurden für 18 h entweder nur in Medium (gestrichelte Linie) oder zusätzlich mit GM-CSF (10 ng/ml) (durchgezogene Linie) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten eines repräsentativen Experimentes sind als Histogrammplot-Overlay dargestellt.

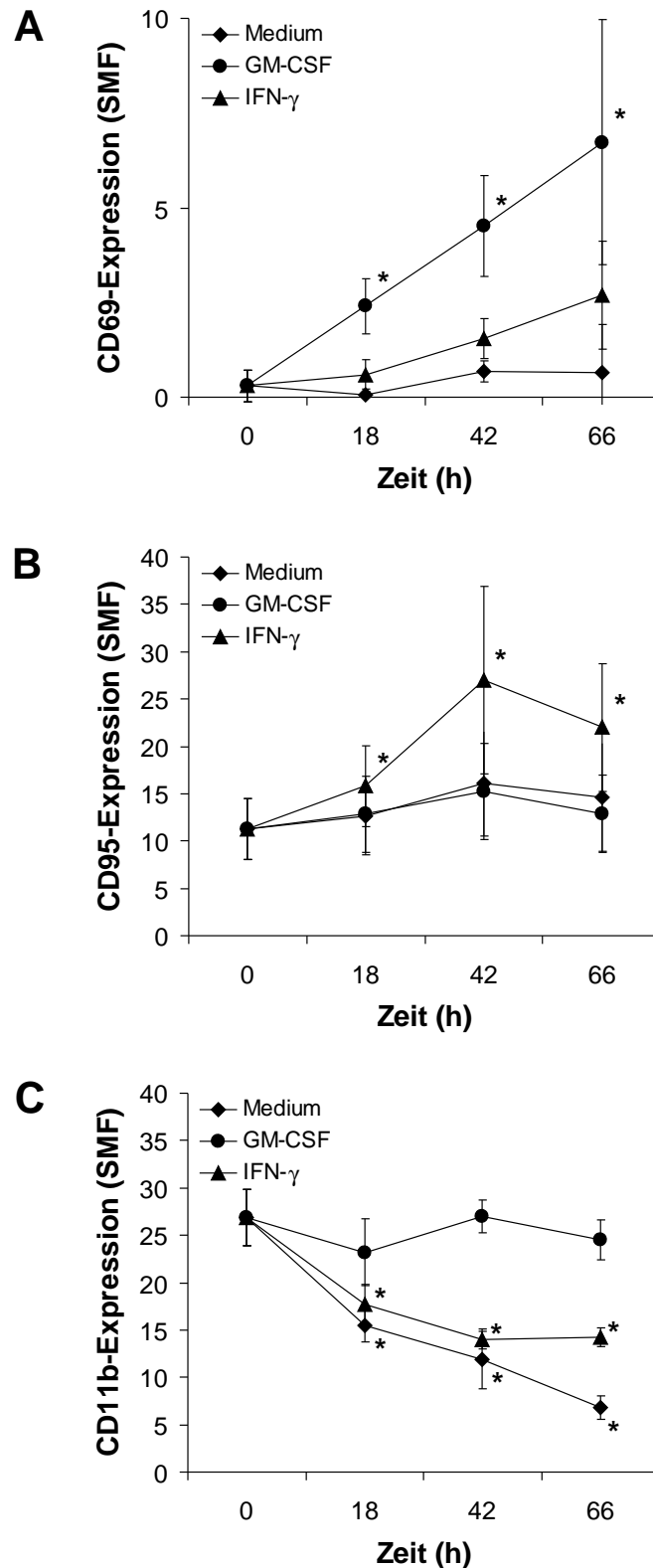


Abbildung 4.2: Expression von CD69, CD95 und CD11b auf humanen eosinophilen Granulozyten. Die Zellen wurden nur in Medium oder zusätzlich mit GM-CSF oder mit IFN- γ (jeweils 10 ng/ml) direkt nach Reinigung inkubiert. Die CD69- (A), CD95- (B) und CD11b-Expression (C) wurde durchflusszytometrisch nach 0 h, 18 h, 42 h und 66 h in fünf voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. Es ist die Differenz der Spezifischen Mittlere Fluoreszenz (SMF) des spezifischen Antikörpersignals und der SMF des Signals mit unspezifischem Kontroll-Antikörper \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Zellen zum Zeitpunkt 0 h.

4.2 In vitro-mRNA-Expression von CD69 in eosinophilen Granulozyten

Um die Expression der CD69-mRNA zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA aus 10^6 gereinigten humanen Eosinophilen pro Stimulationsansatz isoliert, revers transkribiert und mittels RT-PCR amplifiziert. Eosinophile Granulozyten, die nur in Medium kultiviert wurden, exprimierten bereits nach 4 h spezifische CD69-mRNA (Abbildung 4.3A). In Gegenwart von 10 ng/ml GM-CSF ließ sich ein 1,46- bis 2,52-facher Anstieg der spezifischen CD69-mRNA-Menge beobachten (Abbildung 4.3A, B). GM-CSF induziert also neben der Expression des Proteins auch die Transkription von CD69-mRNA.

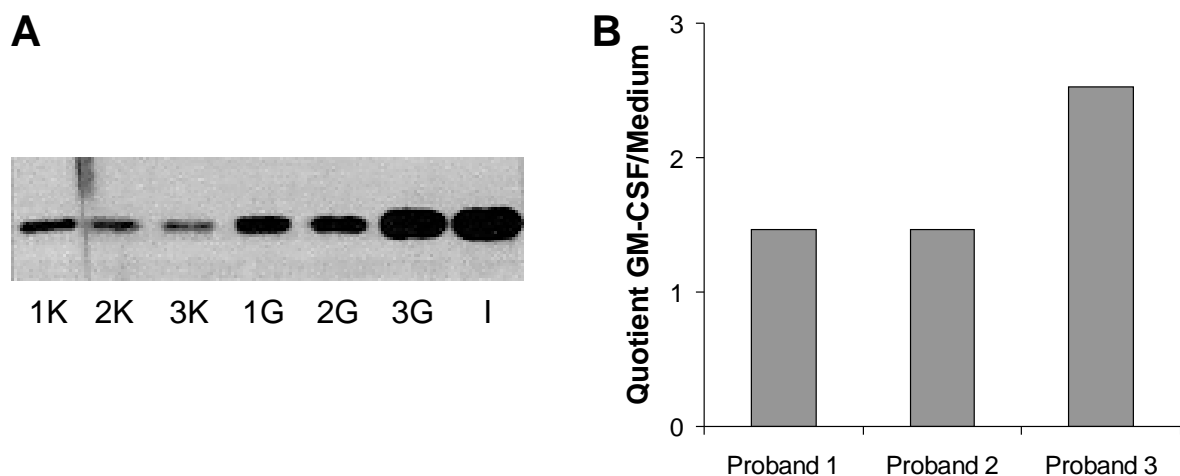


Abbildung 4.3: CD69-mRNA-Expression in humanen eosinophilen Granulozyten. Humane Eosinophile (10^6 /ml) wurden entweder nur in Medium oder zusätzlich mit GM-CSF (10 ng/ml) für 4 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Gesamt-RNA präpariert, wie in "Material und Methoden" (Abschnitt 3.10) beschrieben. Nach reverser Transkription wurde die PCR mit CD69-spezifischen Primern durchgeführt.

A: Photographische Darstellung eines Ethidiumbromid-gefärbten Gels mit den PCR-Produkten von drei unabhängigen Experimenten.

Spur 1K bis 3K: Medium-Kontrolle (4 h) von drei Probanden

Spur 1G bis 3G: GM-CSF (10 ng/ml, 4 h) von den drei gleichen Probanden korrespondierend zu Spur 1 bis 3

Spur I: CD69-Insert (2,5 µg/ml)

B: Densitometrische Auswertung. Dargestellt ist der Quotient der GM-CSF- und der Medium-Bande.

4.3 Einfluss der MMP-9 auf die CD69-Oberflächenexpression auf eosinophilen Granulozyten

Über ihre Beteiligung am Atemwegs-Remodelling hinaus besitzen MMPs auch nicht-proteolytische Funktionen. Beim Asthma bronchiale wird vor allem MMP-9 verstärkt exprimiert (vergleiche Abschnitt 4.14). Deshalb wurde in einem weiteren Ansatz der Frage nachgegangen, ob MMP-9 die Expression der Oberflächen-Antigene modifiziert.

CD11b und CD95 werden im Gegensatz zu CD69, das unter anderem mit GM-CSF induziert werden kann, konstitutiv auf eosinophilen Granulozyten exprimiert. Eosinophile Granulozyten wurden für 48 h mit MMP-9 (0,1 µg/ml) inkubiert (Abbildung 4.4). MMP-9 allein hatte auf die Expression von CD69, CD95 und CD11b keinen Einfluss. Aus diesem Grund wurden die Zellen zusätzlich mit GM-CSF (10 ng/ml) in Abwesenheit oder Gegenwart von MMP-9 inkubiert. Auf die Expression von CD69 (Abbildung 4.4A) und CD95 (Abbildung 4.4B) hatte MMP-9 keinen Effekt. Dagegen zeigte sich in Gegenwart von MMP-9 bei GM-CSF-stimulierten Eosinophilen für CD11b (Abbildung 4.4C) eine Zunahme der Expressionsdichte um $24,30 \% \pm 13,31 \%$ ($p < 0,05$).

Diese Ergebnisse belegen erstmals, dass der Phänotyp eosinophiler Granulozyten durch exogene MMPs moduliert wird. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist derzeit noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

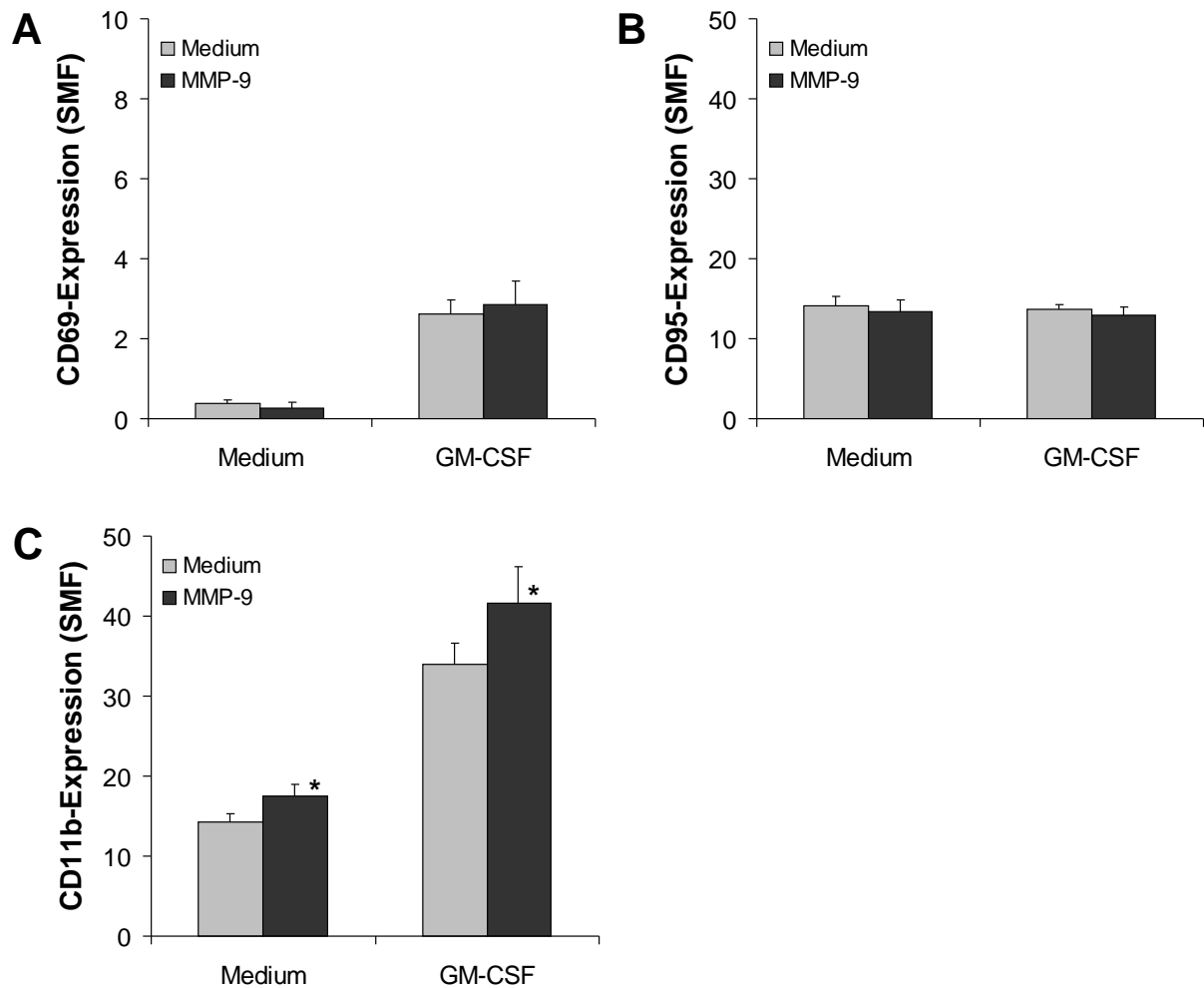


Abbildung 4.4: Einfluss der MMP-9 auf den Phänotyp eosinophiler Granulozyten.

Humane eosinophile Granulozyten wurden aus dem Blut isoliert und mit GM-CSF (10 ng/ml) oder MMP-9 (0,1 µg/ml) oder beiden kombiniert stimuliert. Nach 24 h und 48 h wurde die Oberflächenexpression von CD69 (A), CD95 (B) bzw. CD11b (C) durchflusszytometrisch in zehn voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. Dargestellt sind die 48 h-Daten als Differenz der Spezifischen Mittleren Fluoreszenz (SMF) des spezifischen Antikörpersignals und der SMF des unspezifischen Kontroll-Antikörpersignals. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Zellen, die ohne MMP-9 inkubiert wurden.

4.4 Effekt der CD69- bzw. CD95-Ligation auf Überleben und Apoptose humaner Eosinophiler aus dem peripheren Blut

Um die funktionelle Bedeutung des CD69-Antigens auf eosinophilen Granulozyten genauer zu untersuchen, wurden gereinigte humane Zellen aus dem Blut von allergischen Spendern zunächst auf ihre Überlebenszeit hin untersucht. Hierzu wurden die Zellen in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener Stimuli über 4 Tage inkubiert. Die Viabilität wurde zum Zeitpunkt 0 und nach 18 h, 66 h und 114 h mit Hilfe der Propidiumiodid-Exklusionsmethode gemessen.

In Kontrollmedium überlebten nach 114 h in Kultur nur $0,74 \pm 0,22$ % der Eosinophilen (Abbildung 4.5A). In Gegenwart von GM-CSF oder IFN- γ erhöhte sich die Viabilität auf $38,32 \pm 8,17$ % bzw. $25,42 \pm 5,36$ % (Abbildung 4.5B, C). Anti-CD95-mAk verursachte eine signifikante Reduktion der Viabilität um $49,81 \pm 18,84$ % ($p < 0,05$) bei GM-CSF- und um $79,04 \pm 10,77$ % ($p < 0,05$) bei IFN- γ -stimulierten Zellen (Abbildung 4.5B, C). Im Gegensatz dazu, hatte anti-CD69-mAk keinen Effekt auf IFN- γ -stimulierte Zellen ($-4,48 \pm 14,88$ %, n.s.) (Abbildung 4.5C), während sich bei GM-CSF-stimulierten Zellen eine Tendenz zur Reduktion um $19,67 \pm 11,93$ % ($p < 0,1$) zeigte (Abbildung 4.5B).

Um die Modifikation der Zellviabilität mit der Apoptose in Verbindung zu bringen, wurde zunächst eine Immunzytologie durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen für 90 h mit GM-CSF stimuliert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Mit GM-CSF stimulierte Zellen zeigten nach 90 h eine normale Struktur ohne Apoptose-assoziierte Veränderungen, wie z.B. das „membrane blebbing“ oder eine nukleäre Fragmentierung (Abbildung 4.6 I, IV). Im Gegensatz dazu induzierte die Kostimulation von GM-CSF und anti-CD69-mAk (Abbildung 4.6 II, V) bzw. anti-CD95-mAk (Abbildung 4.6 III, VI) über die abschließenden 72 h diese subzellulären Strukturänderungen.

In einem weiteren Ansatz wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der DNA zur Darstellung der für die Apoptose typischen DNA-Leiter durchgeführt. Die DNA gereinigter Eosinophiler nach 4 Tagen Inkubation ohne Stimulation zeigte die Apoptose-typische Chromatinfragmentation in Form der DNA-Leiter. In Gegenwart

von GM-CSF war diese endonukleotidische DNA-Fragmentation der Zellen nicht nachweisbar. Wurden die Eosinophilen jedoch zusätzlich mit anti-CD69-mAk inkubiert, ließ sich die DNA-Fragmentation selbst bei GM-CSF-stimulierten Zellen darstellen (Abbildung 4.7).

Zusammengenommen bieten die oben dargestellten Untersuchungsergebnisse folgende Hinweise:

- Beim CD69-Oberflächenantigen handelt es sich offenbar um einen funktionell aktiven Rezeptor.
- Engagement von CD69 moduliert die Viabilität und damit das Überleben von eosinophilen Granulozyten.
- Dieser über die Aktivierung des CD69-Rezeptors vermittelte Prozess beinhaltet eine Apoptose.

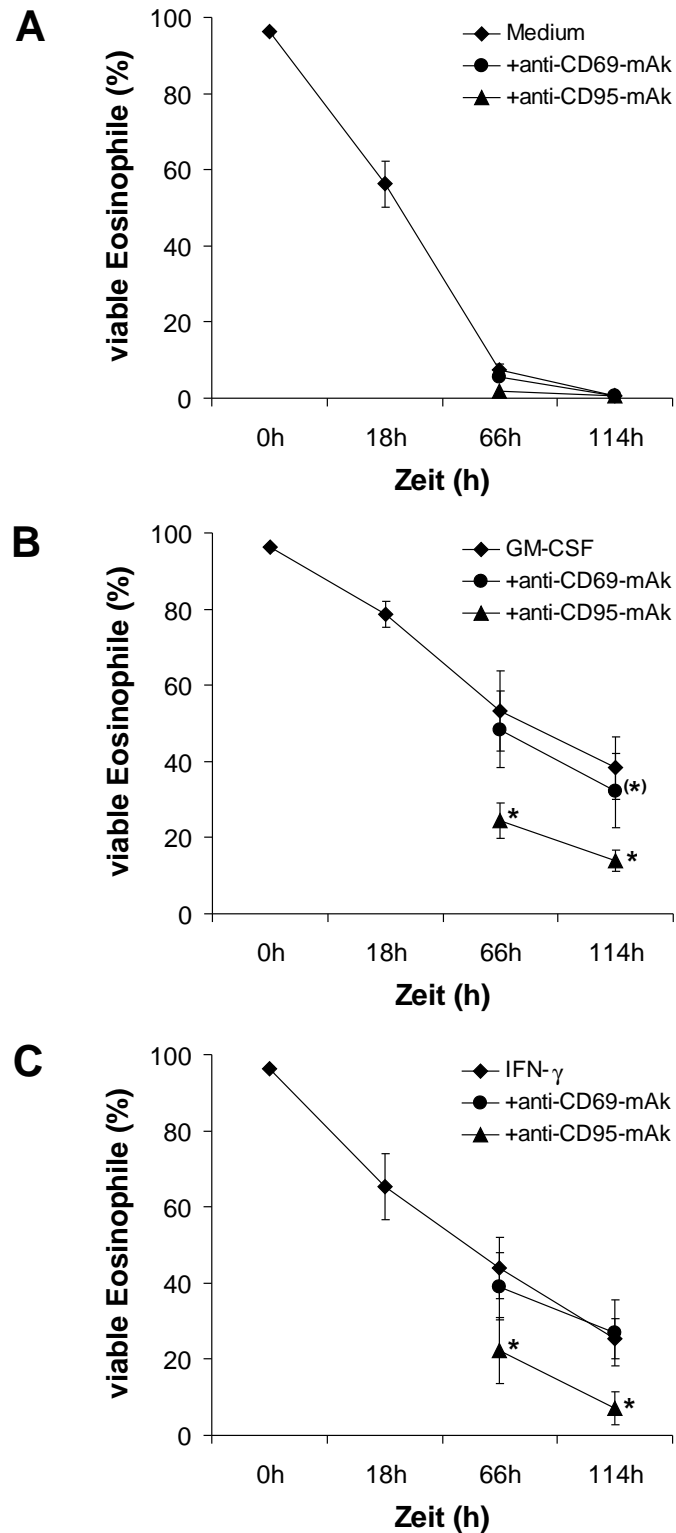


Abbildung 4.5: Effekt von anti-CD69-mAk und anti-CD95-mAk auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten. Die Zellen wurden direkt nach der Reinigung nur mit Medium (A) oder zusätzlich mit GM-CSF (B) oder IFN- γ (C) (jeweils 10 ng/ml) über einen Zeitraum von bis zu 4 Tagen inkubiert. Nach 18 h wurden dem Ansatz Antikörper gegen CD69 (10 μ g/ml) bzw. CD95 (1 μ g/ml) zugegeben. Die Viabilität wurde durchflusszytometrisch mit Propidiumiodid (PI) nach 0 h, 18 h, 66 h und 114 h in fünf voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Antikörper inkubiert waren. (*) $p < 0,10$ im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Antikörper inkubiert waren.

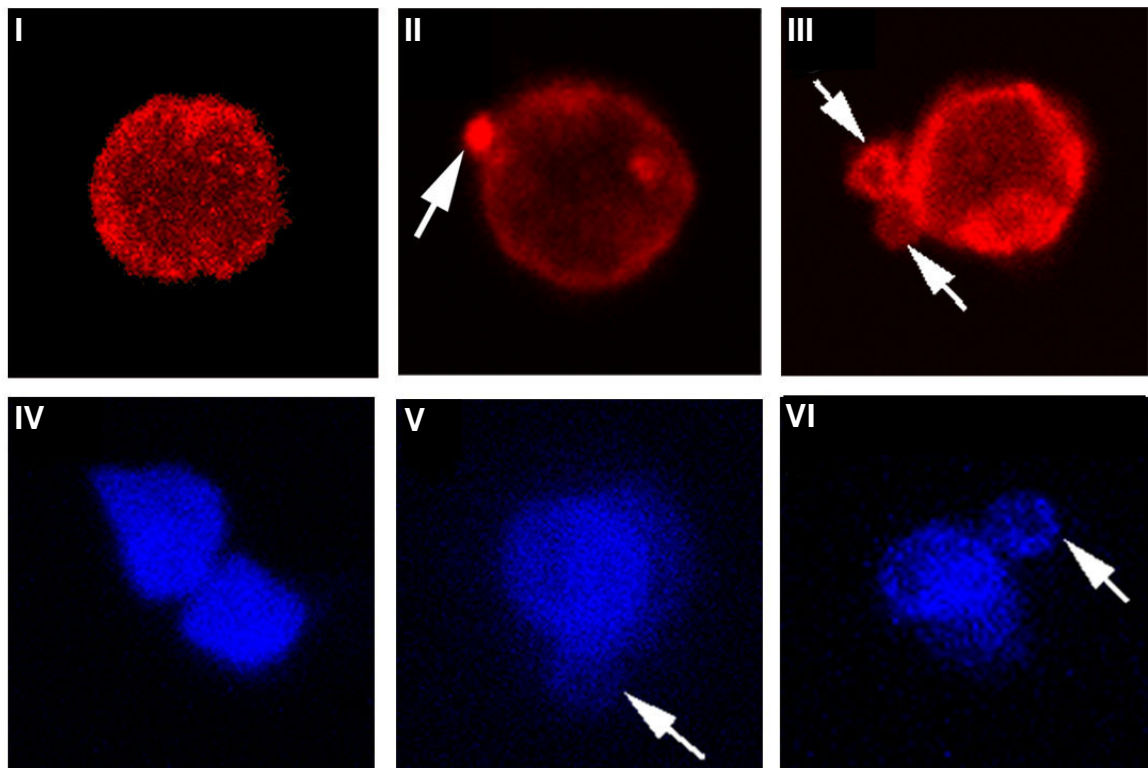


Abbildung 4.6: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung Apoptose-bedingter Strukturänderungen als Effekt von anti-CD69-mAk und anti-CD95-mAk auf eosinophile Granulozyten. Färbung der Zellmembran (I-III) eosinophiler Granulozyten mittels DilC₁₈(3)-DS und der Nuklei (IV-VI) mittels DAPI. Die Zellen wurden für 90 h mit GM-CSF (10 ng/ml) (I, IV) sowie zusätzlich für die letzten 72 h mit anti-CD69-mAk (10 µg/ml) (II, V) bzw. anti-CD95-mAk (1 µg/ml) (III, VI) inkubiert. Pfeile: (II, III) "membrane blebbing", (V, VI) Kernfragmentierung.

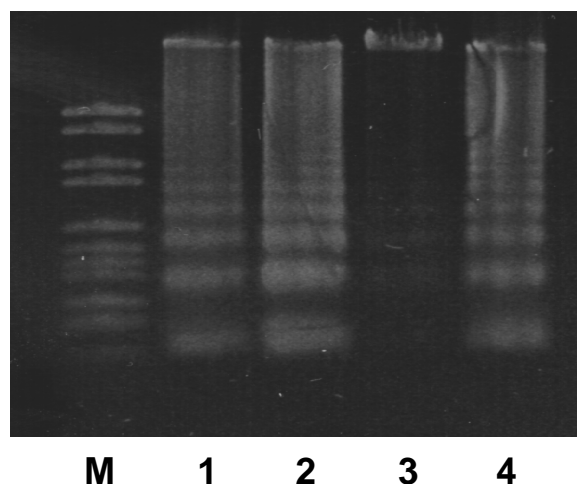


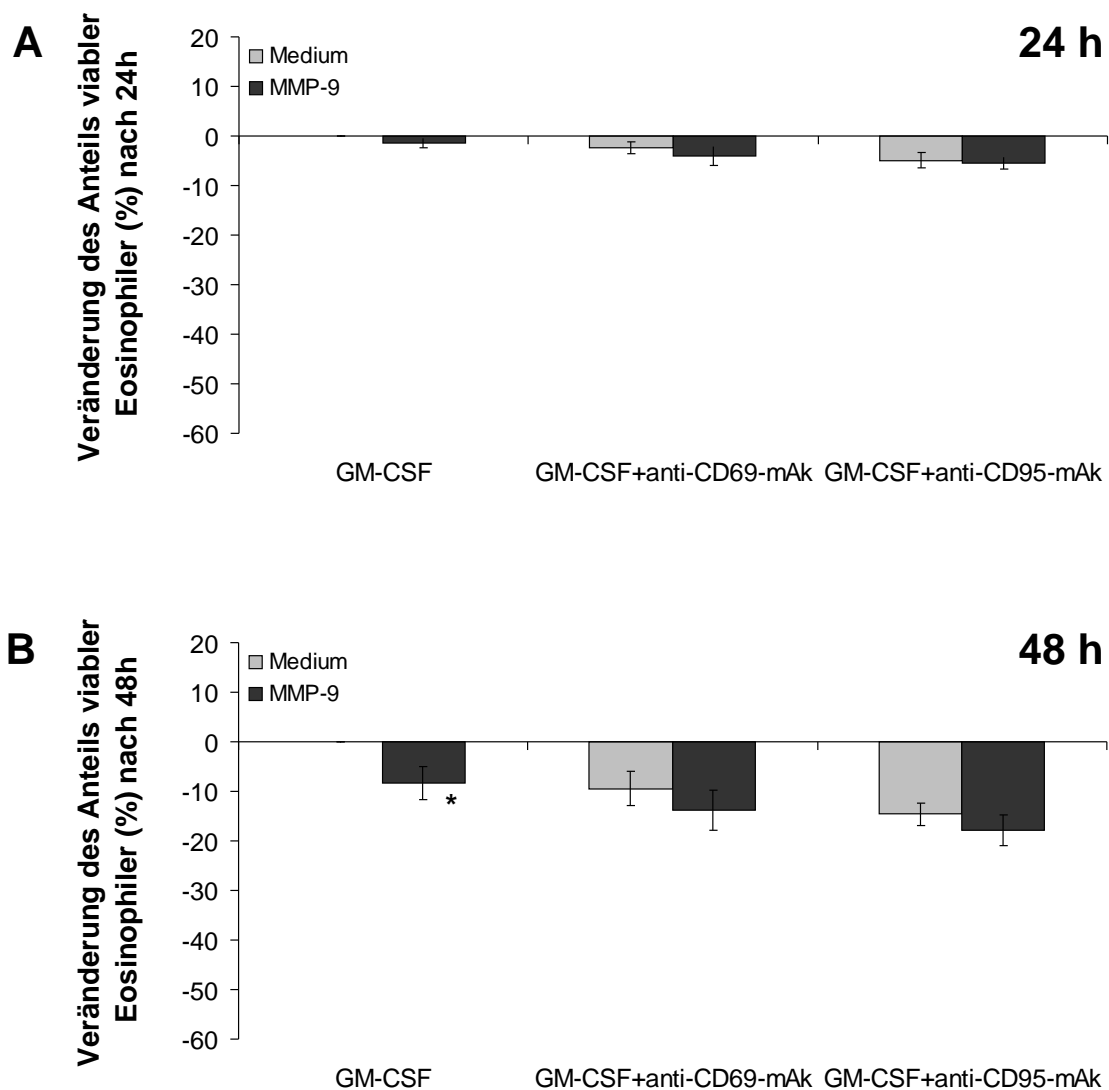
Abbildung 4.7: Effekt von anti-CD69-mAk auf die DNA-Fragmentierung in eosinophilen Granulozyten. Eosinophile wurden für 4 Tage bei 37°C entweder nur mit Medium (Spur 1), mit anti-CD69-mAk (10 µg/ml, Spur 2), mit GM-CSF (10 ng/ml, Spur 3) oder mit GM-CSF + anti-CD69-mAk (Spur 4) inkubiert. "M": Marker. Die DNA-Fragmentierung wurde gelelektrophoretisch dargestellt.

4.5 Einfluss der MMP-9 auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten

Nach der im Abschnitt 4.3 beschriebenen Wirkung von MMP-9 auf den Phänotyp sollte nun geprüft werden, ob die Protease auch die Viabilität eosinophiler Granulozyten beeinflusst. Hierzu wurden gereinigte humane eosinophile Granulozyten über 96 h inkubiert und deren Viabilität nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mit Hilfe der Propidiumiodid-Exklusionsmethode durchflusszytometrisch analysiert.

MMP-9 allein zeigte keinen Einfluss auf die zelluläre Lebensfähigkeit (Daten nicht gezeigt). Auch nach 24 h in Gegenwart von GM-CSF war kein Einfluss der MMP-9 (0,1 µg/ml) auf die Viabilität der Zellen zu beobachten, unabhängig von Kostimulation mit anti-CD69-mAk (10 µg/ml) bzw. anti-CD95-mAk (1 µg/ml) (Abbildung 4.8A). Dagegen führte MMP-9 nach 48 h, 72 h bzw. 96 h zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität GM-CSF-stimulierter eosinophiler Granulozyten um etwa 10 % relativ zur Proteasen-freien Kontrolle (Abbildung 4.8B bis D).

Die Viabilität GM-CSF-stimulierter Zellen nahm nach Zugabe von anti-CD69-mAk und anti-CD95-mAk nach 96 h Inkubation um $9,34 \pm 2,79$ % bzw. $44,56 \pm 4,04$ % ab. Dieser Effekt auf die Viabilität der Zellen wurde in Gegenwart von MMP-9 bei Inkubation mit anti-CD69-mAk signifikant verstärkt ($-20,38 \pm 5,19$ %). Dagegen hatte MMP-9 keinen nachweisbaren Einfluss auf die anti-CD95-mAk-induzierte Viabilität eosinophiler Granulozyten (Abbildung 4.8D).



Legende siehe nächste Seite

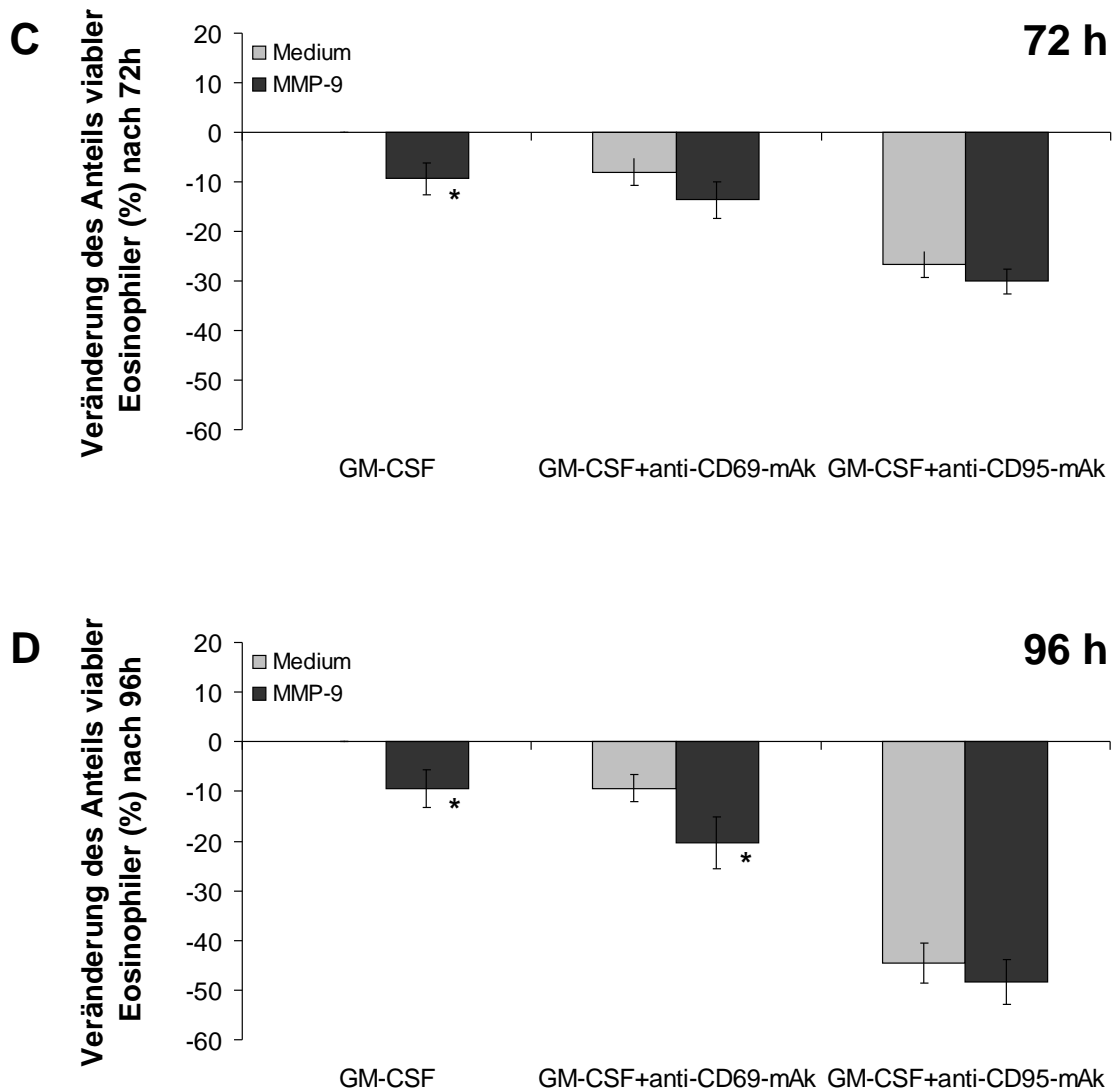


Abbildung 4.8: Einfluss der MMP-9 auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten. Eosinophile Granulozyten wurden aus dem Blut isoliert und mit GM-CSF (10 ng/ml) bzw. MMP-9 (0,1 µg/ml) und anti-CD69-mAk bzw. anti-CD95-mAk stimuliert. Nach 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) und 96 h (D) wurde die Viabilität mittels PI durchflusszytometrisch in zehn voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. Dargestellt ist die relative Abweichung der Viabilität im Verhältnis zu den GM-CSF-stimulierten Zellen. * $p < 0,05$ im Vergleich zu den entsprechenden GM-CSF-stimulierten Zellen.

4.6 Bcl-2-Protein-Expression in humanen peripheren Blut-Eosinophilen

Die Expression von *bcl-2* führt zur Unterdrückung des Apoptoseprozesses in verschiedenen Zelltypen. Seine Rolle in eosinophilen Granulozyten wird bisher kontrovers diskutiert, und die vorliegenden Ergebnisse sind uneinheitlich. Daher wurde in einer eigenen Versuchsreihe der *bcl-2*-Gehalt der Zelle mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie gemessen.

Vor Stimulation zeigten eosinophile Granulozyten eine intrazelluläre *bcl-2*-Expression mit einer SMF von $28,91 \pm 12,73$. Nach 18 h Inkubation stieg diese basale Expression auf $57,67 \pm 14,63$ an und nahm anschließend wieder auf $21,57 \pm 4,92$ nach 66 h ab (Abbildung 4.9, 4.10). Stimulation mit GM-CSF- oder IFN- γ zeigte keinen Effekt auf die *bcl-2*-Expression nach 18 h. Nach 66 h war die *bcl-2*-Expression jedoch mehr als doppelt so hoch wie die unstimulierter Zellen (GM-CSF: $54,02 \pm 23,76$; IFN- γ : $57,95 \pm 30,06$) (Abbildung 4.9, 4.10).

In Gegenwart von anti-CD11b-mAk im Kulturmedium zeigte sich keine signifikante Änderung der *bcl-2*-Expression, verglichen mit der Kontrolle ohne Antikörper (Abbildung 4.9, 4.10). Wurde statt anti-CD11b-mAk anti-C69-mAk oder anti-CD95-mAk eingesetzt, nahm die intrazelluläre *bcl-2*-Konzentration in stimulierten Zellen deutlich ab (GM-CSF + anti-CD69-mAk: $38,53 \pm 20,73$; GM-CSF + anti-CD95-mAk: $35,33 \pm 17,40$; IFN- γ + anti-CD69-mAk: $31,93 \pm 16,72$; IFN- γ + anti-CD95-mAk: $27,43 \pm 15,65$) (Abbildung 4.9, 4.10). Anti-CD69-mAk führte zu einer 45,81%igen und anti-CD95-mAk zu einer 42,95%igen Reduktion von *bcl-2*, bezogen auf die GM-CSF-stimulierten Zellen ohne Antikörperzugabe.

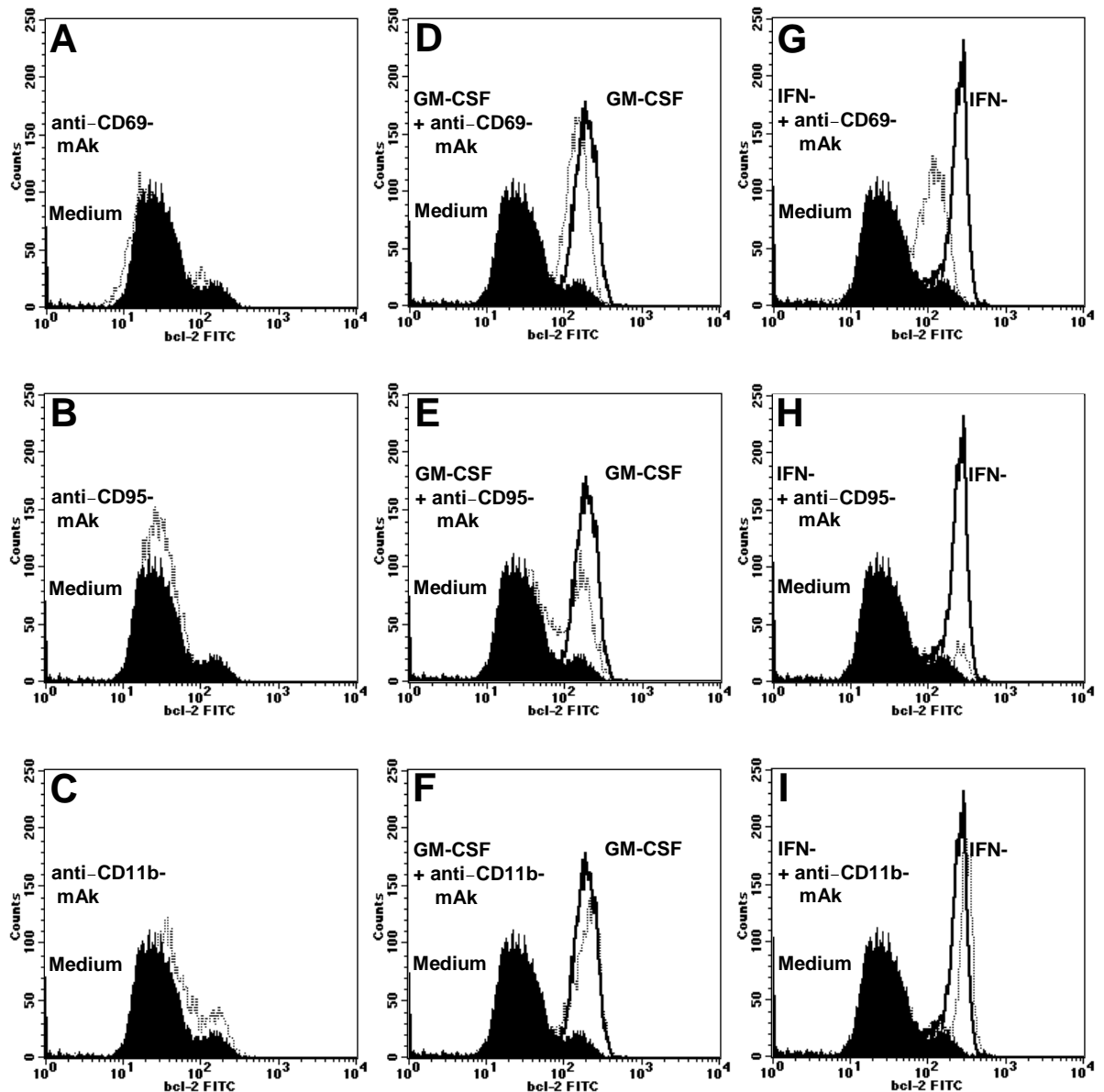


Abbildung 4.9: Effekt von anti-CD69-mAb bzw. anti-CD95-mAb auf die intrazelluläre *bcl-2*-Expression humaner eosinophiler Granulozyten. Die Zellen wurden entweder nur in Medium (A-C) oder zusätzlich mit GM-CSF (D-F) oder IFN- γ (G-I) (jeweils 10 ng/ml) direkt nach Isolation inkubiert. Nach 18 h Kultur wurden Antikörper gegen CD69 (10 μ g/ml), CD95 (1 μ g/ml) bzw. CD11b (10 μ g/ml) hinzugegeben. Die *bcl-2*-Expression wurde durchflusszytometrisch nach 66 h bestimmt. Die Ergebnisse sind als Histogrammplot-Overlays eines repräsentativen von fünf unabhängigen Experimenten dargestellt. Gezeigt wird die Fluoreszenzintensitätsverteilung der Zellen in logarithmischer Auftragung (geschlossene Fläche: Medium, durchgezogene Linie: GM-CSF/IFN- γ , gestrichelte Linie: GM-CSF/IFN- γ + mAb).

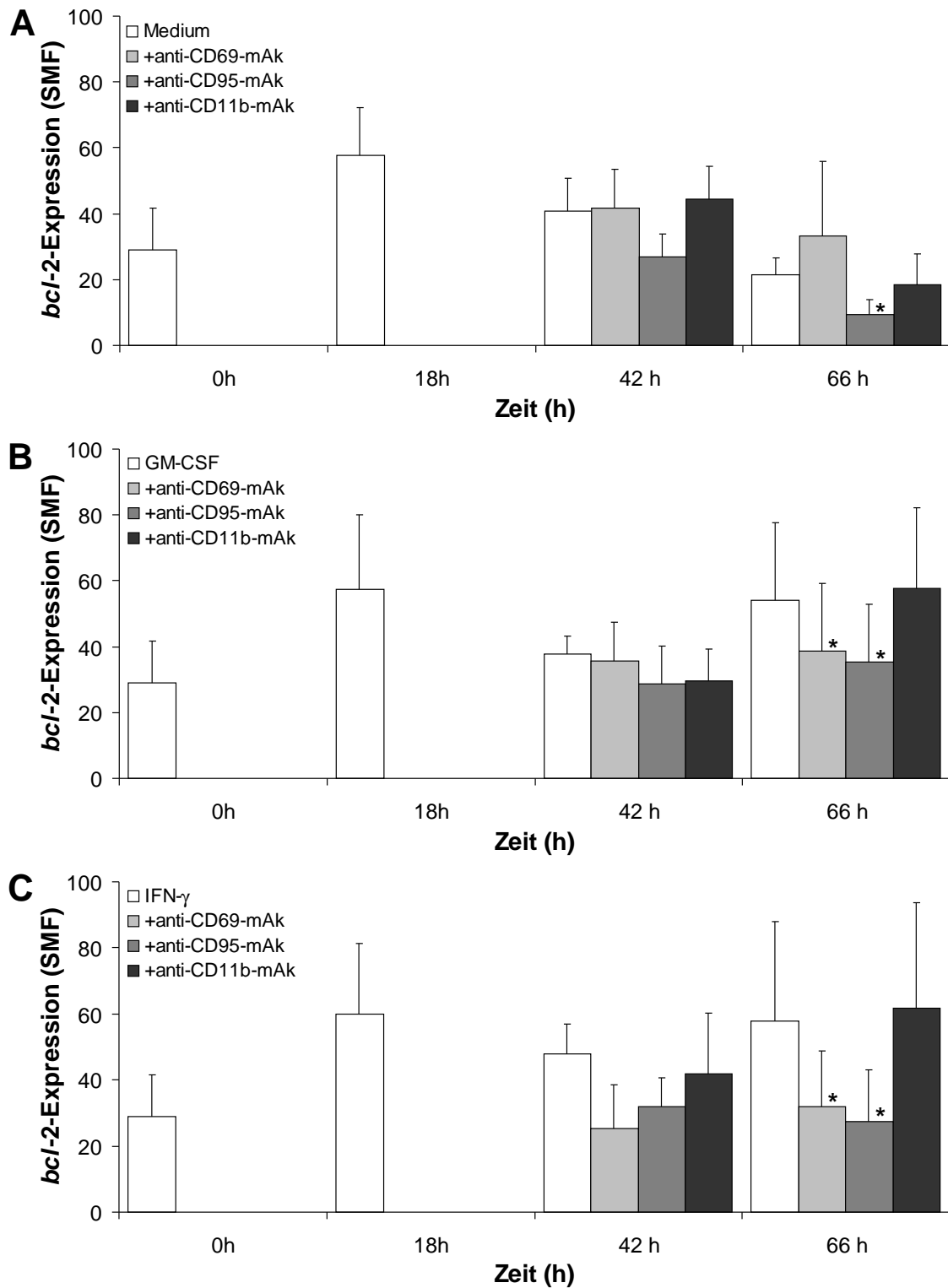


Abbildung 4.10: Effekt von anti-CD69-mAk bzw. anti-CD95-mAk auf die intrazelluläre *bcl-2*-Expression humaner eosinophiler Granulozyten. Die Zellen wurden entweder nur in Medium (A) oder zusätzlich mit GM-CSF (B) oder IFN- γ (C) (jeweils 10 ng/ml) direkt nach Isolation inkubiert. Nach 18 h Kultur wurden Antikörper gegen CD69 (10 μ g/ml), CD95 (1 μ g/ml) bzw. CD11b (10 μ g/ml) hinzugegeben. Die *bcl-2*-Expression wurde durchflusszytometrisch nach 0 h, 18 h, 42 h und 66 h bestimmt. Die Daten sind als Differenz der SMF des spezifischen Antikörpers und der SMF des unspezifischen Kontrollantikörpers dargestellt und beruhen auf fünf voneinander unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Antikörper inkubiert wurden.

4.7 Vergleichende Expression Apoptose-relevanter Proteine in humanen eosinophilen Granulozyten

Neben *bcl-2* spielen auch andere Proteine aus der gleichen Familie eine Rolle bei der Apoptose. Ebenso wie *bcl-2* hat *bcl-x_L* eine anti-apoptotische Funktion, während *bax* und *bcl-x_S* pro-apoptotisch wirken. Die Beteiligung dieser Proteine an der CD69-vermittelten Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten wurde mittels RT-PCR unter Verwendung eines Multiplex-Primer-Sets überprüft, das zusätzlich noch einen Primer für die Caspase-3 beinhaltet.

Eosinophile Granulozyten aus dem peripheren Blut wurden in Gegenwart von GM-CSF (10 ng/ml) über 24 h inkubiert. 4 h vor Beendigung der Inkubation wurden anti-CD69-mAk (10 µg/ml) dem Ansatz zugefügt. Anschließend wurden die Eosinophilen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurde die PCR mit dem Multiplex-Primer-Set durchgeführt.

Nach Stimulation mit GM-CSF war die mRNA für Caspase-3, *bcl-2*, *bcl-x_L* und *bax* nachweisbar, nicht jedoch für *bcl-x_S* (Abbildung 4.11A). Die Zugabe von anti-CD69-mAk 4 h vor Inkubationsende führte zu einem Anstieg der Expression von Caspase-3, *bcl-2* und *bax*. Die Expression von *bcl-x_L* änderte sich hingegen nicht (Abbildung 4.11B).

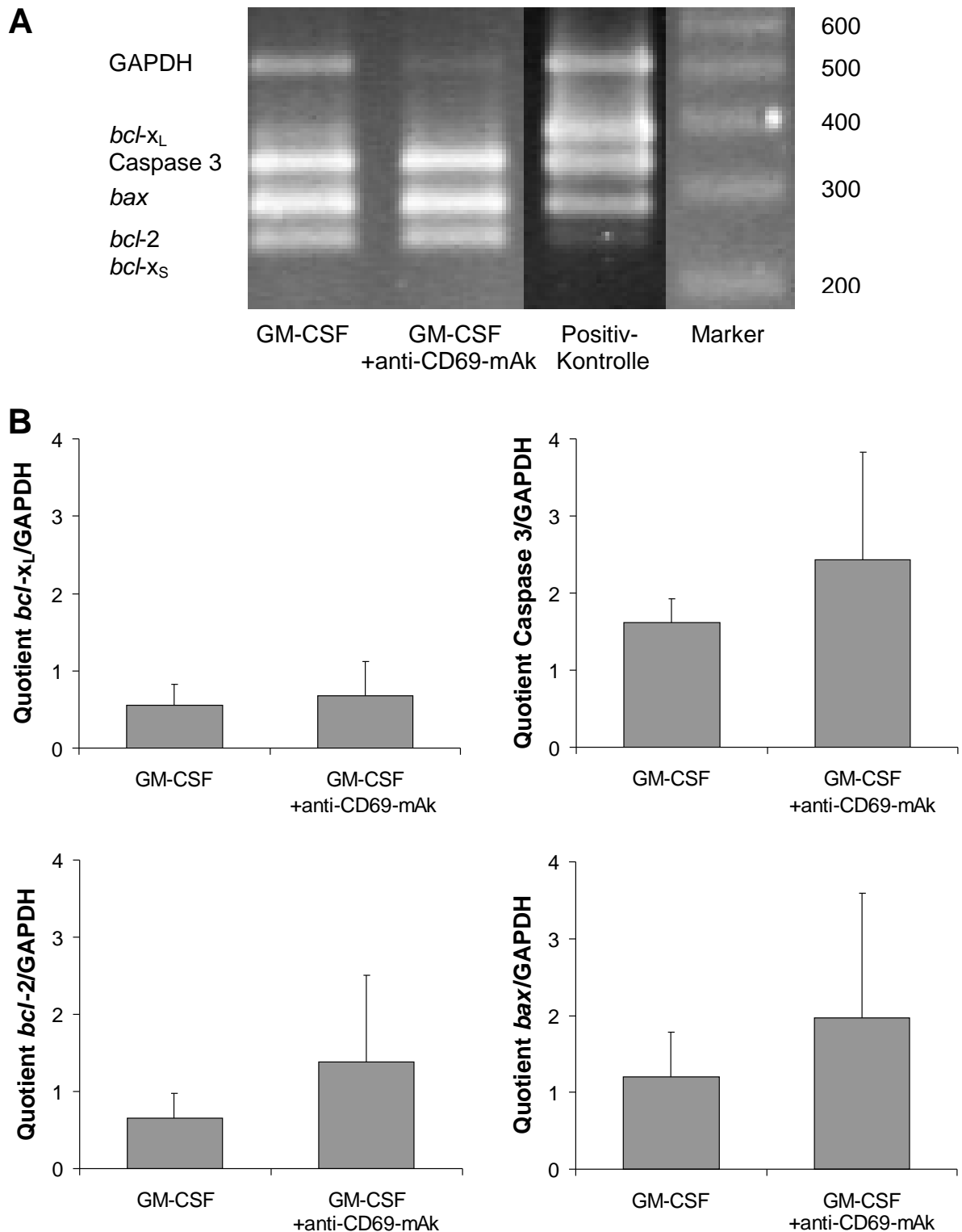


Abbildung 4.11: Einfluss von anti-CD69-mAk (10 ng/ml) auf die mRNA-Expression von Caspase-3, *bcl-x_L*, *bcl-2* und *bax* nach GM-CSF-Stimulation (10 µg/ml). Zellen wurden in Gegenwart von GM-CSF (10 ng/ml) über 24 h inkubiert. 4 h vor Beendigung der Inkubation wurden anti-CD69-mAk (10 µg/ml) dem Ansatz zugefügt. Anschließend wurden die Eosinophilen lysiert und die zelluläre Gesamt-RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurde die PCR mit einem Multiplex-Primer-Set durchgeführt.

A: Foto eines repräsentativen Gels; **B:** densitometrische Auswertung von Caspase-3, *bcl-x_L*, *bcl-2* und *bax* in Bezug auf GAPDH (n=6).

4.8 Beteiligung von CD95 an der CD69-induzierten Viabilitätsreduktion eosinophiler Granulozyten

Um zu analysieren, ob an der CD69-induzierten Apoptose das CD95/CD95L-System über eine CD69-vermittelte Sekretion des CD95L beteiligt ist, wurden humane eosinophile Granulozyten für 114 h zusätzlich zu GM-CSF, anti-CD69-mAk und anti-CD95-mAk mit einem anti-CD95-mAk ohne intrinsische, den Rezeptor stimulierende Aktivität (Rezeptorblocker, CD95RB), inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mit Hilfe der Propidiumiodid-Exklusionsmethode durchflusszytometrisch analysiert.

Anti-CD69-mAk reduzierte die Viabilität GM-CSF-stimulierter Eosinophiler von $41,22 \pm 5,43 \%$ auf $37,44 \pm 6,09 \%$ ($p < 0,1$, $n = 5$), anti-CD95-mAk von $41,22 \pm 5,43 \%$ auf $24,09 \pm 5,81 \%$ ($p < 0,05$, $n = 5$) (Abbildung 4.12). Der CD95RB erhöhte die Viabilität auf das Niveau GM-CSF-stimulierter Zellen ($42,98 \pm 8,31 \%$), aber nur nach anti-CD95-mAk-vermittelter Viabilitätsreduktion (Abbildung 4.12). Auf die anti-CD69-mAk-vermittelte Viabilitätsreduktion war dagegen kein Einfluss erkennbar (Abbildung 4.12).

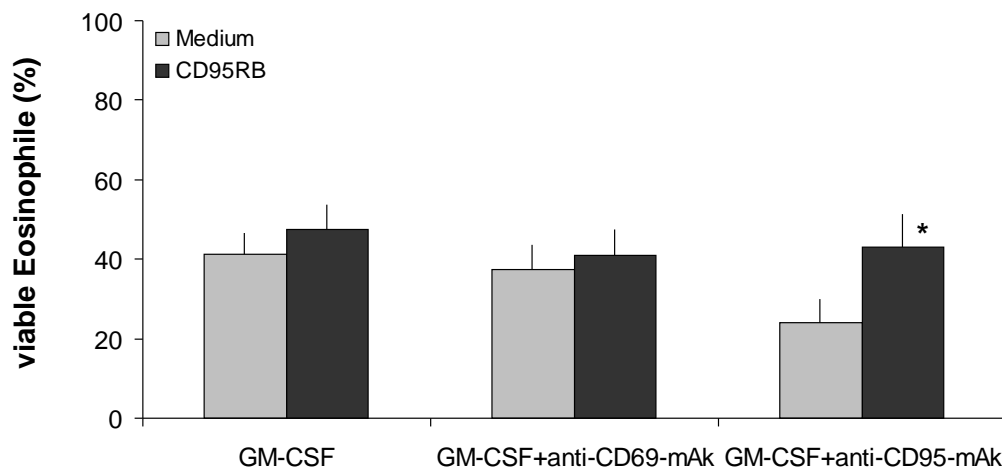


Abbildung 4.12: Einfluss von CD95RB (1 µg/ml) auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten. Die Zellen wurden mit GM-CSF (10 ng/ml) direkt nach Isolation inkubiert. Zusätzlich wurden Antikörper gegen CD69 (10 µg/ml) und CD95 (1 µg/ml) und der CD95RB hinzugegeben. Die Viabilität wurde durchflusszytometrisch mittels PI nach 114 h bestimmt. $n=5$, * $p < 0,05$ im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Inhibitor inkubiert wurden.

4.9 Beteiligung der PI3K an der CD69-induzierten Viabilitätsreduktion eosinophiler Granulozyten

An der CD69-Signaltransduktion könnte die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) γ beteiligt sein, die durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine aktiviert wird ¹⁴¹. PI3K sind u.a. an der Regulation der Apoptose beteiligt ¹⁶⁹.

Um zu analysieren, ob am Engagement der CD69- und CD95-Rezeptoren die PI3K beteiligt ist, wurden humane eosinophile Granulozyten für 114 h zusätzlich zu GM-CSF, anti-CD69-mAk und anti-CD95-mAk mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY-294002 inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mit Hilfe der Propidiumiodid-Exklusionsmethode durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die PI3K-Inhibitoren keinen Einfluss auf die anti-CD69-mAk-vermittelte Viabilitätsreduktion GM-CSF-stimulierter Eosinophiler haben (Abbildung 4.13A, B).

Dagegen wurde die anti-CD95-mAk-vermittelte Viabilitätsreduktion GM-CSF-stimulierter Eosinophiler sowohl durch Wortmannin als auch durch LY-294002 zwar nur gering, aber signifikant von $24,09 \pm 5,81 \%$ auf $21,86 \pm 5,73 \%$ bzw. $19,18 \pm 4,92 \%$ reduziert ($p < 0,05$, $n = 5$) (Abbildung 4.13A, B).

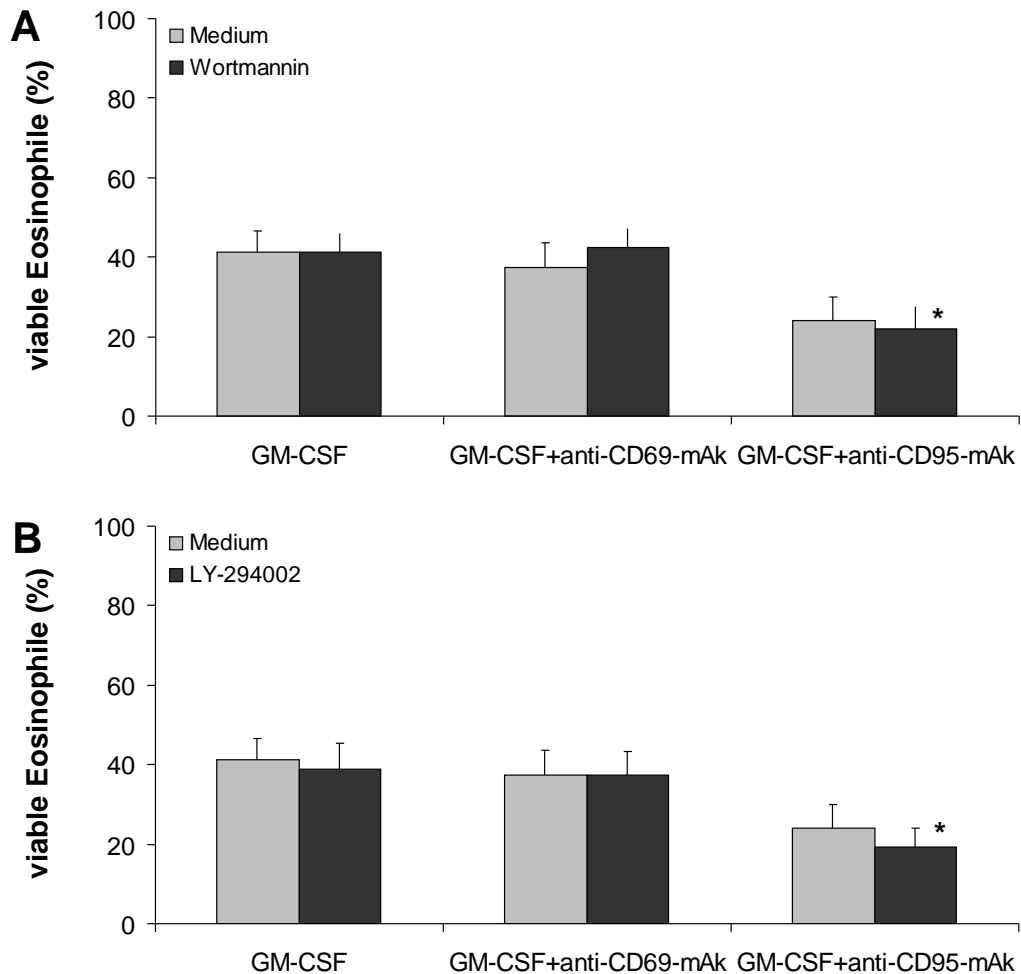


Abbildung 4.13: Einfluss der PI3K-Inhibitoren Wortmannin (A, 25 μ M) und LY-294002 (B, 1 μ M) auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten. Die Zellen wurden mit GM-CSF (10 ng/ml) direkt nach Isolation inkubiert. Zusätzlich wurden Antikörper gegen CD69 (10 μ g/ml) und CD95 (1 μ g/ml) und die jeweiligen Inhibitoren hinzugegeben. Die Viabilität wurde durchflusszytometrisch mittels PI nach 114 h bestimmt. n=5, * p<0,05 im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Inhibitor inkubiert wurden.

4.10 Effekt der Caspase-3-, -8- und -9-Inhibitoren auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten

Caspasen gelten als Initiator- und Effektormoleküle bei der apoptotischen Signalvermittlung der Zelle. Sie kommen in allen Zelltypen vor. Ihre Rolle in eosinophilen Granulozyten ist jedoch noch nicht im Detail geklärt.

Es sollte analysiert werden, ob und in welcher Form die Caspasen-Kaskade am Engagement der CD69-, CD95- und CD11b-Rezeptoren beteiligt ist. Dazu wurden humane eosinophile Granulozyten für 96 h zusätzlich zu GM-CSF, anti-CD69-mAk, anti-CD95-mAk und anti-CD11b-mAk mit den Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK (allgemeiner Caspaseinhibitor), Z-DEVD-FMK (Caspase-3), Z-IETD-FMK (Caspase-8) und Z-LEHD-FMK (Caspase-9) inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mit Hilfe der Propidiumiodid-Exklusionsmethode durchflusszytometrisch bestimmt.

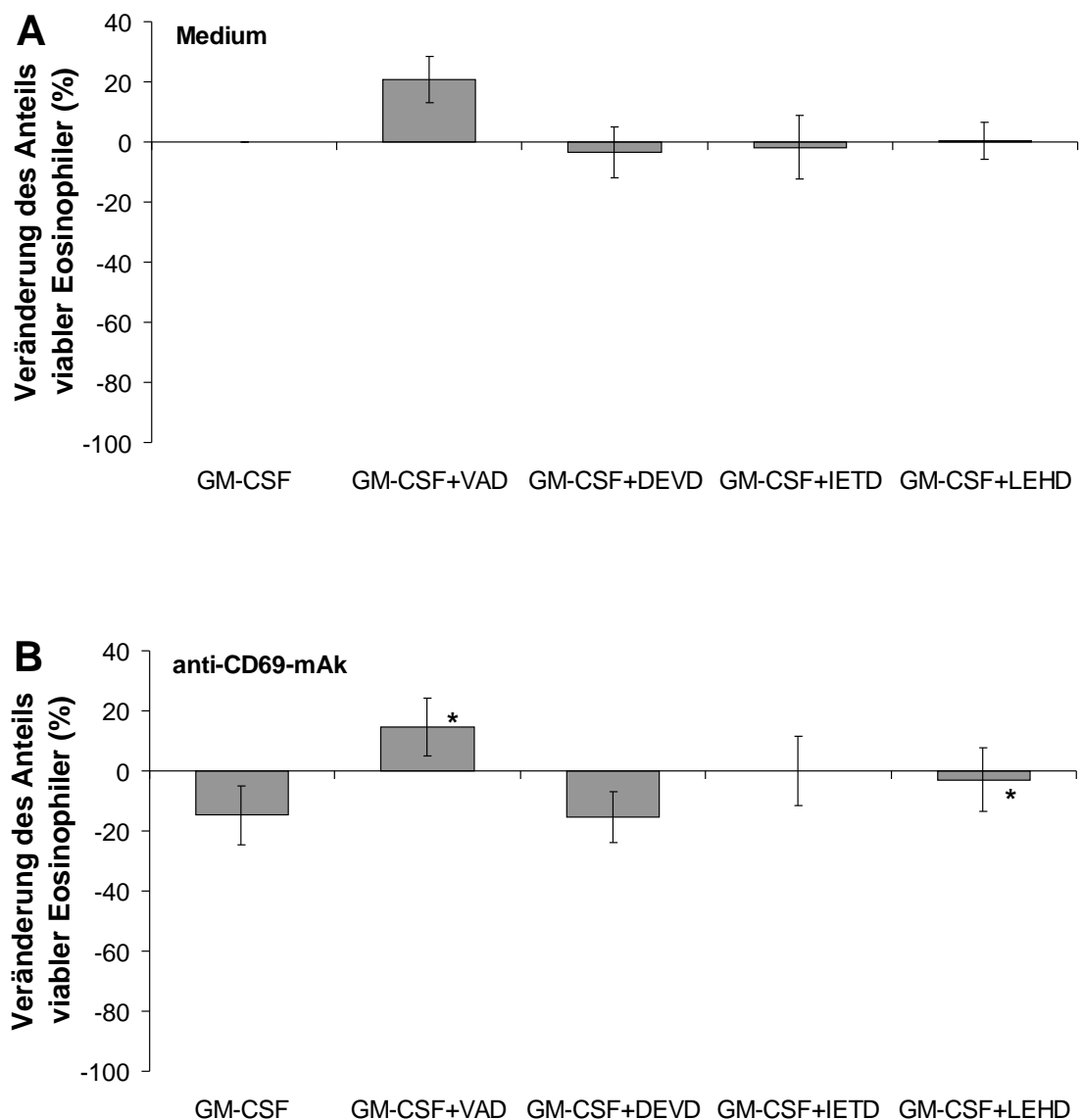
Die Ergebnisse zeigen, dass die Viabilität GM-CSF-stimulierter humaner Eosinophiler nach 96 h nur durch den unspezifischen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK beeinflusst wurde, nicht dagegen durch die übrigen Inhibitoren. Die Anwesenheit von Z-VAD-FMK erhöhte die Viabilität eosinophiler Granulozyten um $20,71 \pm 7,81 \%$, bezogen auf den GM-CSF-Wert (Abbildung 4.14A).

Anti-CD69-mAk reduzierte die Viabilität GM-CSF-stimulierter Eosinophiler um $14,73 \pm 9,90 \%$. Die Caspase-8- und Caspase-9-Inhibitoren Z-IETD-FMK und Z-LEHD-FMK neutralisierten diese Reduktion, wobei nur der Caspase-9-Inhibitor zu einem signifikanten Ergebnis führte. Im Gegensatz dazu hatte der Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK keinen Einfluss, während der unspezifische Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK, wie bei den nur mit GM-CSF-stimulierten Zellen, zu einer Erhöhung der Viabilität führte (Abbildung 4.14B).

Die Viabilität GM-CSF-stimulierter eosinophiler Granulozyten wurde durch anti-CD95-mAk um $62,97 \pm 9,72 \%$ gesenkt. Auch hier zeigte der unspezifische Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK den stärksten Effekt. Dagegen reduzierten die Caspase-3-, Caspase-8- und Caspase-9-Inhibitoren Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK und

Z-LEHD-FMK diese Viabilitätssenkung auf $49,51 \pm 5,15 \%$, $28,79 \pm 4,94 \%$ bzw. $46,55 \pm 4,12 \%$, wobei sich nur bei dem Wert für den Caspase-8-Inhibitor Signifikanz zeigte (Abbildung 4.14C).

Inkubation der GM-CSF-stimulierten eosinophilen Granulozyten mit anti-CD11b-mAk hatte keinen Einfluss auf die Viabilität. Als einziger Caspase-Inhibitor zeigte der unspezifische Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK eine Wirkung, indem er die Viabilität erhöhte (Abbildung 4.14D).



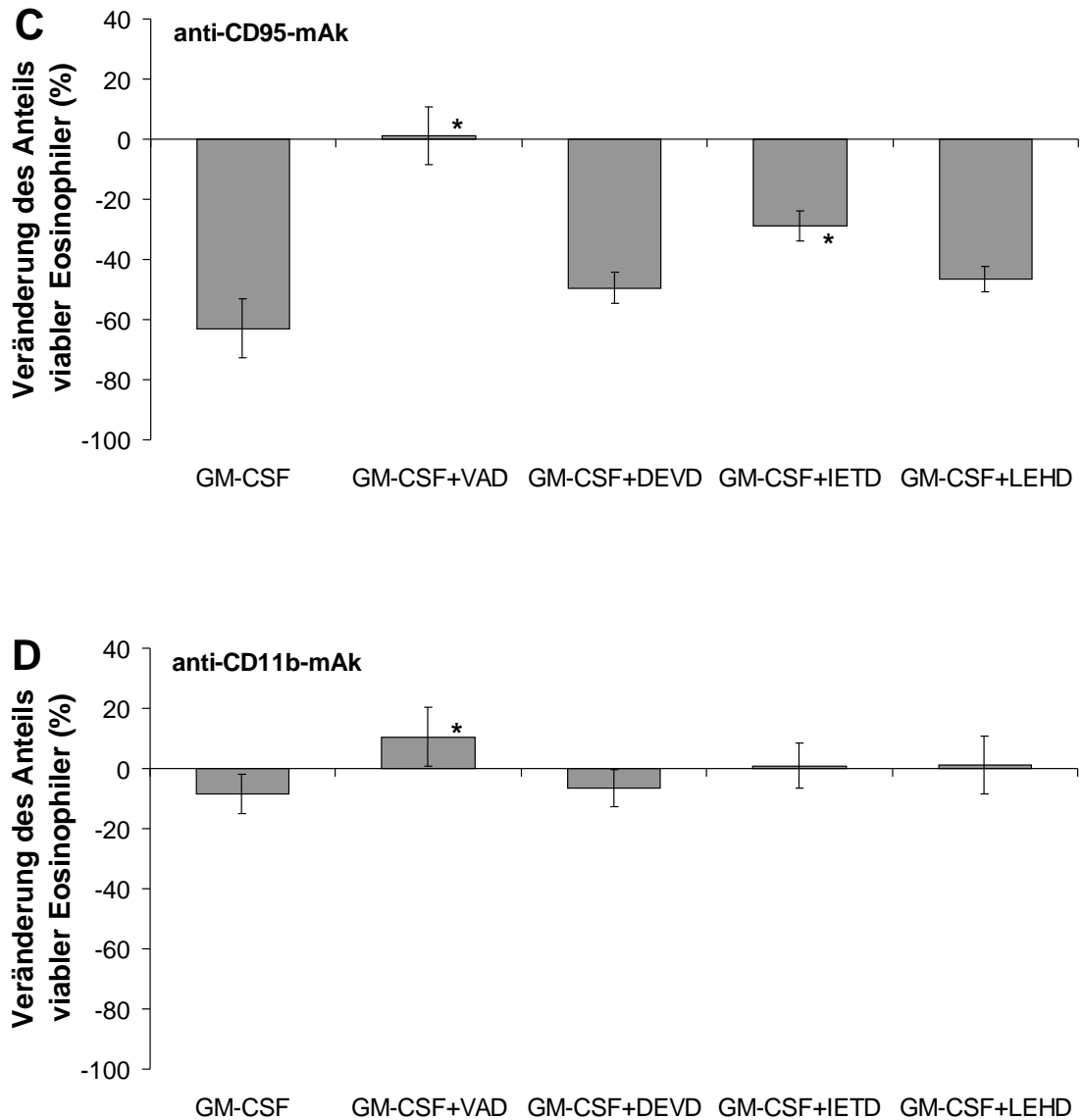


Abbildung 4.14: Einfluss der Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK (allgemeiner Caspaseinhibitor), Z-DEVD-FMK (Caspase-3), Z-IETD-FMK (Caspase-8) und Z-LEHD-FMK (Caspase-9) (jeweils 20 μ M) auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten. Die Zellen wurden entweder nur in Medium oder zusätzlich mit GM-CSF (10 ng/ml) direkt nach Isolation inkubiert. Zusätzlich wurden Antikörper gegen CD69 (10 μ g/ml), CD95 (1 μ g/ml) bzw. CD11b (10 μ g/ml) und die Caspase-Inhibitoren (jeweils 20 μ M) hinzugegeben. Die Viabilität wurde durchflusszytometrisch mittels PI nach 96 h bestimmt. Dargestellt ist die relative Abweichung der Viabilität im Verhältnis zu den GM-CSF-stimulierten Zellen. n=5, * p<0,05 im Vergleich zu den entsprechenden GM-CSF-stimulierten Zellen.

4.11 Humanes Modell der allergischen Entzündung

4.11.1 Klinischer Aspekt

Die Instillation von spezifischem Allergen durch das Bronchoskop induzierte innerhalb weniger Minuten eine Konstriktion der Bronchien mit Anschwellen der Atemwegsschleimhaut und führte zu einer Verengung der Atemwege bei allen untersuchten Probanden. Diese auf ein Mukosaödem bzw. eine Muskelkontraktion zurückführbare Reaktion war nach 18 h nicht mehr nachweisbar. Allerdings ließ sich nach diesem Intervall im allergenprovozierten Segment im Vergleich zum kochsalzprovozierten Segment und zu den umgebenden Bronchien eine hyperämische Mukosa erkennen.

Die Allergeninstillation in zwei verschiedenen Segmenten der rechten Lunge wurde von allen Probanden gut toleriert. Obwohl die FEV_1 in % vom Soll von $100,35 \pm 4,84 \%$ vor der Allergenprovokation auf $83,76 \pm 5,52 \%$ 18 h nach der Provokation signifikant abfiel, berichtete kein Proband von asthmatischen Beschwerden, wie beispielsweise Giemen, Husten oder Dyspnoe.

4.11.2 Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit

Die Rückgewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit reichte im kochsalzprovozierten Segment von 31 bis 68 ml (Mittelwert \pm SEM: $47,9 \pm 4,2$ ml, $n=11$) bei der Lavage 10 min nach Provokation und von 45 bis 80 ml ($60,1 \pm 3,3$ ml, $n=11$) 18 h nach Provokation. Aus dem allergenprovozierten Segment, das 10 min nach der Provokation lavagiert wurde, ließen sich 27 bis 64 ml ($48,1 \pm 3,6$ ml, $n=11$) BAL-Flüssigkeit zurückgewinnen. Das 18 h nach Provokation aspirierte Volumen aus dem provozierten Segment lag mit 58 bis 88 ml ($64,5 \pm 2,8$ ml, $n=11$) signifikant höher ($p<0,05$).

4.11.3 Gesamtzellzahl, Differenzialzytologie

Die Verteilung der Entzündungszellen während der frühen und späten Phase der asthmatischen Reaktion wurde bei elf Probanden mit intermittierendem Asthma

(Schweregrad I) mittels Zellzählung untersucht, wie in Material und Methoden beschrieben (Abschnitt 3.11). Die aspirierte Lavage-Flüssigkeit aus dem Kontroll- und dem allergenprovozierten Segment wurde gesammelt und für die Zellquantifizierung aufbereitet. 10 min nach Provokation fand sich kein Unterschied in der absoluten Zellzahl oder der Differenzialzytologie zwischen der Allergen- und der Kontrollseite (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber gab es eine hoch signifikante Zunahme der Eosinophilen 18 h nach segmentaler Allergenprovokation (Kontrolle 10 min: $0,38 \pm 0,10 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$, Kontrolle 18 h: $3,03 \pm 2,08 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$, $n=10$, $p=n.s.$; Allergen 10 min: $0,24 \pm 0,08 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$, 18 h: $15,89 \pm 7,31 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$, $n=11$, $p<0,05$, jeweils im Vergleich zu den Werten der Kontrolle nach 18 h und der Allergenseite nach 10 min) (Abbildung 4.15). Auch die Zahl der Neutrophilen stieg von $0,42 \pm 0,08 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$ (Kontrolle) bzw. $0,17 \pm 0,05 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$ (Allergen) 10 min nach Allergenprovokation auf $9,92 \pm 7,76 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$ und $4,58 \pm 1,39 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$ 18 h später an ($p<0,05$ jeweils im Vergleich zu den 10 min-Werten). Im Vergleich dazu wurde kein signifikanter Unterschied bei der absoluten Zahl der Lymphozyten (Kontrolle 10 min: $3,30 \pm 0,66 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$; Kontrolle 18 h: $2,87 \pm 0,41 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$, Allergen 10 min: $2,04 \pm 0,62 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$; Allergen 18 h: $4,40 \pm 1,47 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$; $p=n.s.$) und der Makrophagen im Kontrollsegment (10 min: $17,07 \pm 2,35 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$; 18 h: $17,75 \pm 4,42 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$) beobachtet, während die Zahl der Makrophagen einen tendenziellen Anstieg im allergenprovozierten Segment 18 h nach Provokation zeigte (10 min: $7,12 \pm 1,47 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$; 18 h: $14,10 \pm 3,82 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$; $p<0,1$) (Abbildung 4.15).

Die vorliegenden Daten bestätigen die dominante Rolle des Eosinophilen beim Asthma und zeigen, dass, selbst wenn leichte Asthmatiker Allergenen ausgesetzt werden, eine signifikante Einwanderung großer Zahlen Eosinophiler in das Lungengewebe erfolgt.

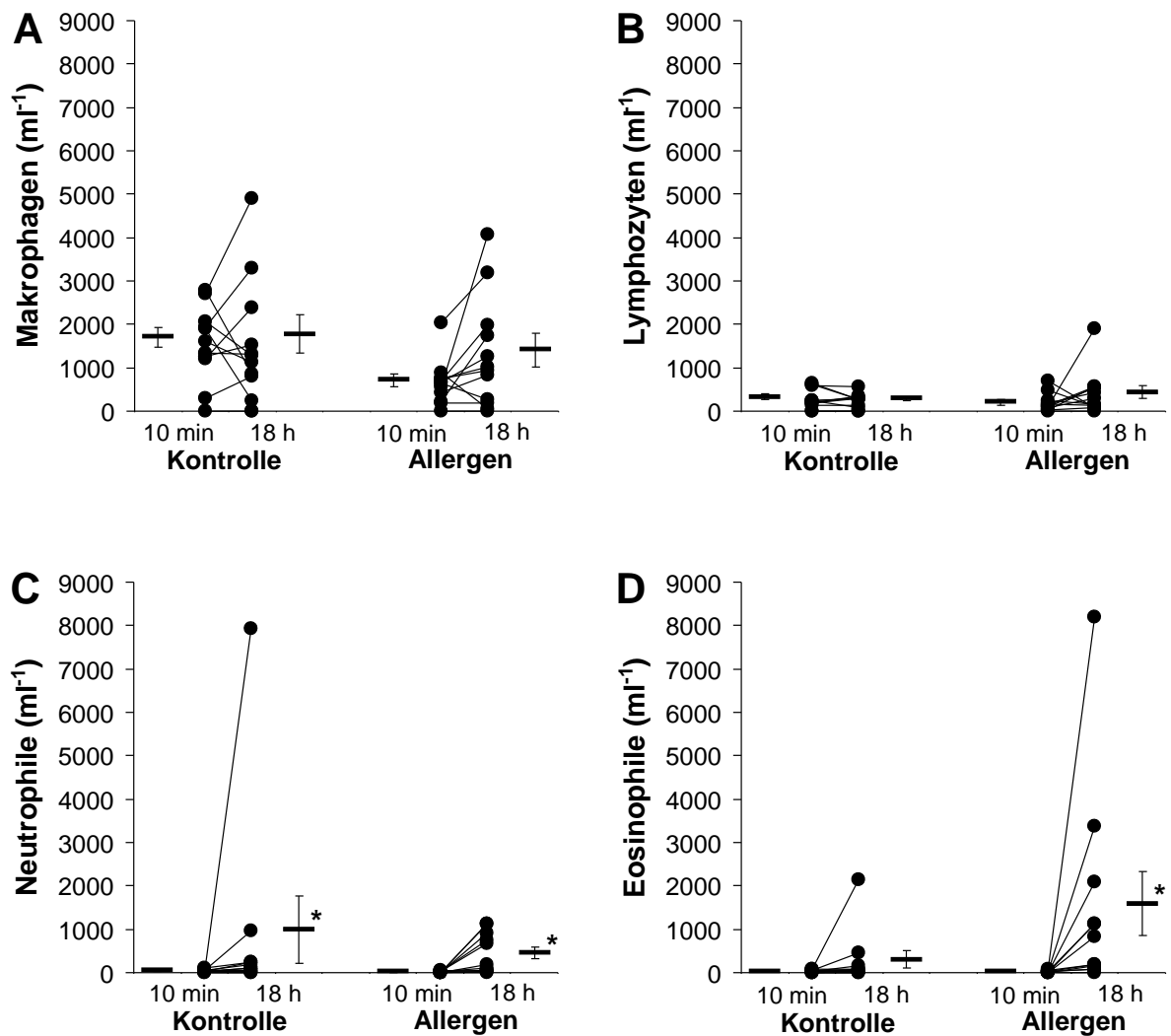


Abbildung 4.15: Verteilung der Zellzahlen der unterschiedlichen Zellpopulationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit in Kontroll- und allergenprovozierten Segmenten 10 min bzw. 18 h nach segmentaler Allergenprovokation. Zusätzlich zu den Einzelwerten ist jeweils die mittlere absolute Zellzahl pro Milliliter aspirierter Lavageflüssigkeit \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ zwischen den provozierten Segmenten 18 h nach Provokation und den Kontrollsegmenten 18 h und 10 min nach Provokation. $n=10$ für die Kontrollen, $n=11$ für die provozierten Segmente.

4.12 Phänotyp eosinophiler Granulozyten *in vivo*

Die Zunahme der Zahl eosinophiler Granulozyten innerhalb von 18 h nach Exposition der Atemwege mit spezifischem Allergen unterstreicht die Bedeutung dieses Zelltyps für die asthmatische Entzündung. Aus diesem Grund sollte der Phänotyp der Eosinophilen im Hinblick auf verschiedene charakteristische Oberflächenantigene (CD69, CD95, CD11b) analysiert werden.

Das CD69-Antigen gilt als Aktivierungsmarker für Eosinophile^{114,120}. Um den Aktivierungszustand der Zellen zu charakterisieren, wurde in dieser Studie die *in vivo*-Expression von CD69 auf Eosinophilen 10 min und 18 h nach segmentaler Allergenprovokation durchflusszytometrisch untersucht und mit den Ergebnissen von Blutzellen verglichen. Eosinophile, die 10 min nach segmentaler Provokation aus Blut gewonnen wurden, zeigten keine CD69-Expression auf ihrer Oberfläche, bei einem Mittelwert der SMF von $0,16 \pm 0,10$ (n=6). Im Gegensatz dazu, zeigten Eosinophile aus den Kontrollsegmenten ($3,36 \pm 1,43$, n=6) und den allergenprovozierten Segmenten 10 min nach Provokation eine leicht gesteigerte Antigen-Expression ($2,66 \pm 0,83$, n=8). Die CD69-Expression auf Eosinophilen aus der BAL-Flüssigkeit 18 h nach Provokation stieg nur im allergenprovozierten Segment, dort aber signifikant, auf $4,39 \pm 0,78$ (n=8) an, während sie im Blut mit $0,63 \pm 0,42$ (n=6) und im Kontrollsegment bei $2,14 \pm 0,60$ (n=6) unverändert blieb (Abbildung 4.16A, 4.17A).

Als weitere Oberflächenantigene wurden CD95 und CD11b analysiert. Die CD95-Expression betrug 10 min nach Provokation $7,26 \pm 1,44$ (n=6) im Blut, $7,06 \pm 2,91$ (n=6) im Kontrollsegment und $8,97 \pm 3,59$ (n=8) im allergenprovozierten Segment. 18 h nach Provokation betrug die Expression $9,27 \pm 2,35$ (n=6) auf Blutzellen, $7,09 \pm 3,22$ (n=6) und $8,56 \pm 2,59$ (n=8) auf Zellen aus den kochsalz- und allergenprovozierten Segmenten (Abbildung 4.16B, 4.17B). Im Gegensatz zu CD69 zeigte sich also bei der CD95-Expression kein Effekt der Provokation.

Die CD11b-Expression erhöhte sich zwischen 10 min und 18 h nach Provokation sowohl im Blut als auch in den kochsalz- und allergenprovozierten Segmenten (Blut: $32,61 \pm 2,32$ auf $34,14 \pm 7,01$, n=5, Kontrollsegment: $14,07 \pm 5,96$ auf $18,50 \pm 4,32$, n=5, allergenprovoziertes Segment: $20,76 \pm 7,33$ auf $40,46 \pm 5,85$, n=8,

Abbildung 4.16C, 4.17C). Wie auch die CD69-Expression war die CD11b-Expression durch Allergenprovokation nach 18 h signifikant erhöht.

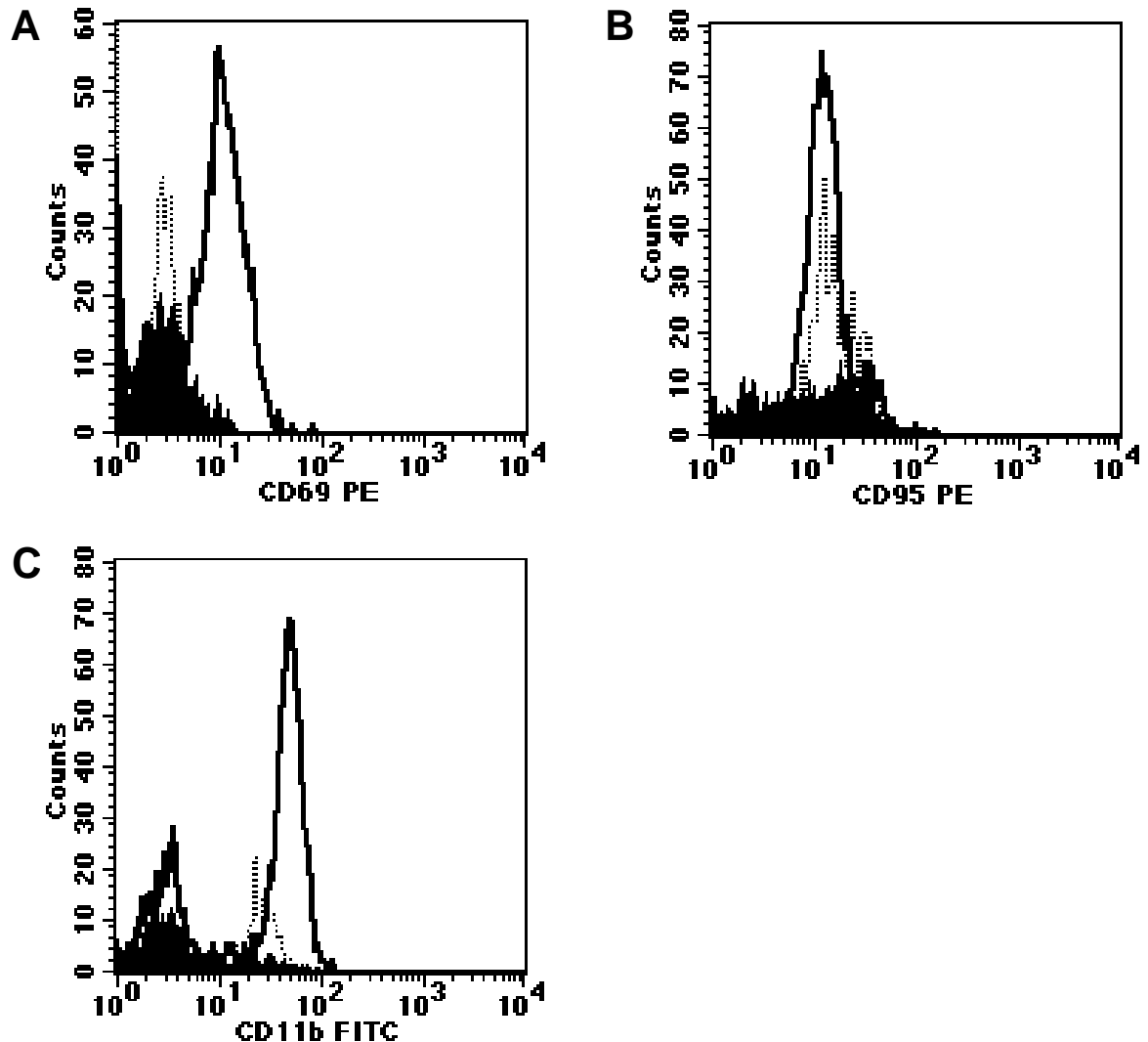


Abbildung 4.16: Fluoreszenzintensitäts-Verteilung der Expression von CD69 (A), CD95 (B) und des Kontrollantigens CD11b (C) auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut und der bronchoalveolären Lavage aus Kontroll- und allergenprovozierten Segmenten 18 h nach endobronchialer Allergeninstillation. Die logarithmische Fluoreszenzintensität der Oberflächenantigen-Expression eines repräsentativen Experiments 18 h nach Allergenprovokation ist als Histogrammplot-Overlay dargestellt (gestrichelte Linie: Blut, geschlossene Fläche: Kontroll-Segment, durchgezogene Linie: allergenprovoziertes Segment).

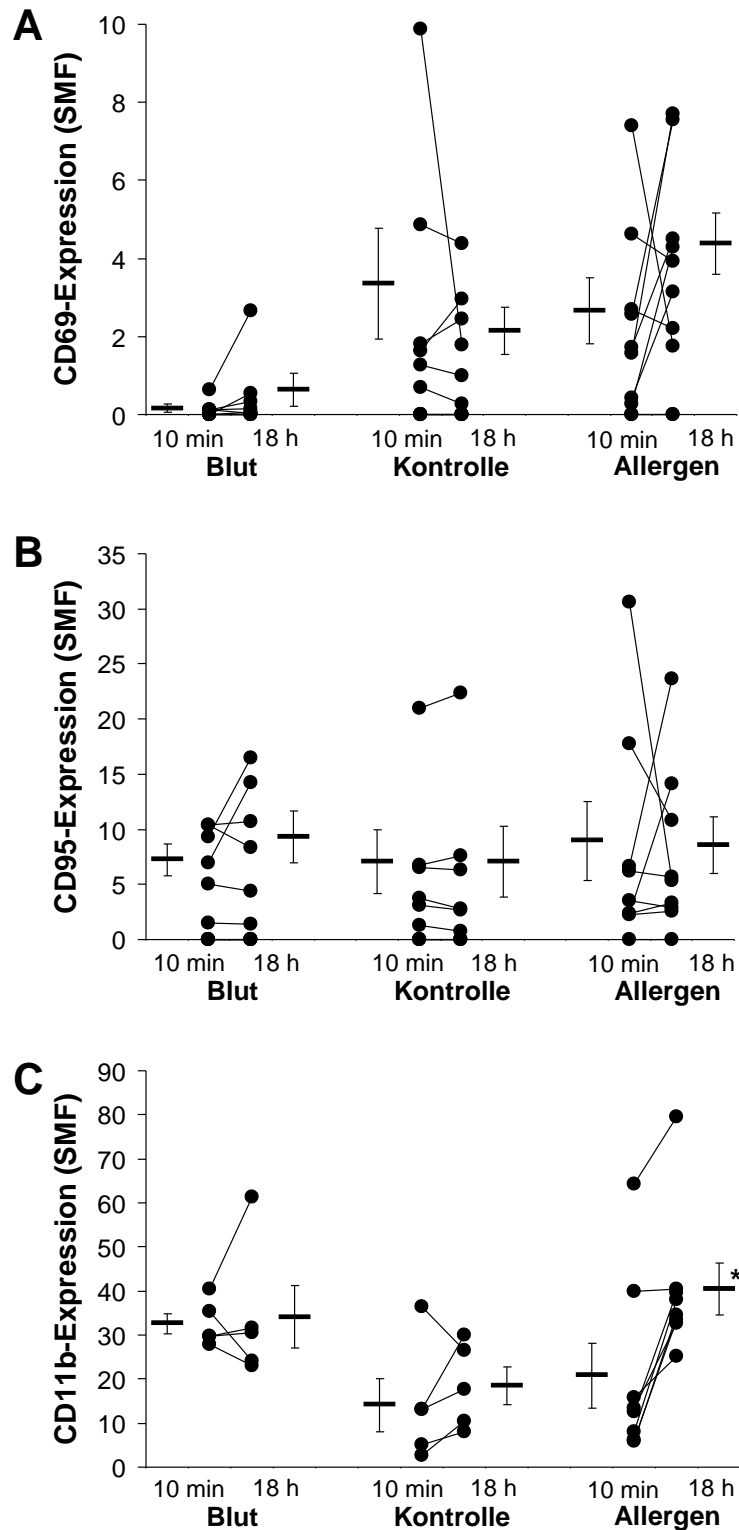


Abbildung 4.17: Expression von CD69 (A), CD95 (B) und des Kontrollantigens CD11b (C) auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut und der bronchoalveolären Lavage aus Kontroll- und allergenprovozierten Segmenten 10 min und 18 h nach endobronchialer Allergeninstillation. Die Antigen-Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt, daraus sind Einzelwerte von fünf (C: Blut und Kontroll-Segment), sechs (A, B: Blut und Kontroll-Segment) bzw. acht (A, B, C: allergenprovoziertes Segment) voneinander unabhängigen Experimenten und die jeweiligen Mittelwerte der Spezifischen Mittleren Fluoreszenz (SMF) \pm SEM wiedergegeben. * $p < 0,05$ im Vergleich zum 10 min-Wert.

4.13 Zusammenfassung der Experimente zum Phänotyp humaner eosinophiler Granulozyten

Die differenzielle Expression der Oberflächenantigene wird durch die bisher dargestellten *in vivo*- und *in vitro*-Experimente deutlich. Während CD95 praktisch ausschließlich durch IFN- γ *in vitro* hochreguliert wird, nimmt die Expression von CD11b im Kontrollmedium und in Gegenwart von IFN- γ ab, aber 18 h nach Allergenprovokation *in vivo* zu. GM-CSF schließlich neutralisiert die *in vitro* zu beobachtende Abnahme der CD11b-Expressionsdichte. Diese Ergebnisse sprechen indirekt dafür, dass GM-CSF während der allergischen Entzündung eine größere Rolle zukommt als IFN- γ .

Diese Schlussfolgerung wird durch die differenzielle Expression des CD69-Antigens bestätigt. Denn die CD69-Expression im Kontrollsegment nimmt ab oder bleibt unverändert. Im Gegensatz dazu steigt die Expression im allergenprovozierten Segment *in vivo* sowie in Gegenwart der Zytokine GM-CSF und IFN- γ *in vitro* an. Neben Zytokinen wird der Phänotyp eosinophiler Granulozyten auch durch die Gegenwart exogener MMP-9 moduliert. Die funktionelle Bedeutung dieser phänotypischen Änderungen bleibt zunächst noch unklar. CD11b ist ein Adhäsionsmolekül und gilt auf eosinophilen Granulozyten ebenso wie CD69 als ein Aktivierungsmarker.

CD95 gilt als der „klassische“ Todesrezeptor, dessen Engagement eine Apoptose der Zelle einleitet. Eine Zunahme der Expressionsdichte ist im hier verwendeten Modell *in vivo* jedoch nicht festzustellen.

Die Funktion des CD69-Antigens auf eosinophilen Granulozyten ist nicht bekannt. Es wird als Aktivierungsmarker betrachtet, was durchaus mit den oben präsentierten Daten in Einklang steht, da seine Expression sowohl nach Allergenprovokation als auch in Gegenwart der Zytokine hochreguliert wird. Wie in den vorausgehenden Kapiteln dargestellt, dürfte CD69 bei humanen eosinophilen Granulozyten an der Regulation der Viabilität dieser Zellen beteiligt sein.

4.14 MMP-9-Expression *in vivo*

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Proteasen, die am Gewebeumbau beteiligt sind, wie er auch beim Wachstum, bei der Wundheilung oder beim Atemwegs-Remodelling im Rahmen chronischer Entzündungen beobachtet wird. Um die Rolle von MMPs bei Asthma zu untersuchen, wurde im Folgenden die Expression der Kollagen-abbauenden MMP-9 (Gelatinase-B) am Modell der segmentalen Allergenprovokation analysiert.

Zum Zeitpunkt der allergischen Spätreaktion 18 h nach Allergenprovokation ließ sich in den Atemwegen eine signifikante Zunahme der MMP-9-Konzentration sowohl im Kontroll- als auch im allergenprovozierten Segment nachweisen (Abbildung 4.18). Im Kontrollsegment stieg die Konzentration dabei von $1,58 \pm 0,56$ ng/ml auf $9,58 \pm 2,52$ ng/ml um das 6,1-fache und im allergenprovozierten Segment von $2,80 \pm 1,93$ ng/ml auf $11,02 \pm 2,80$ ng/ml um das 3,9-fache.

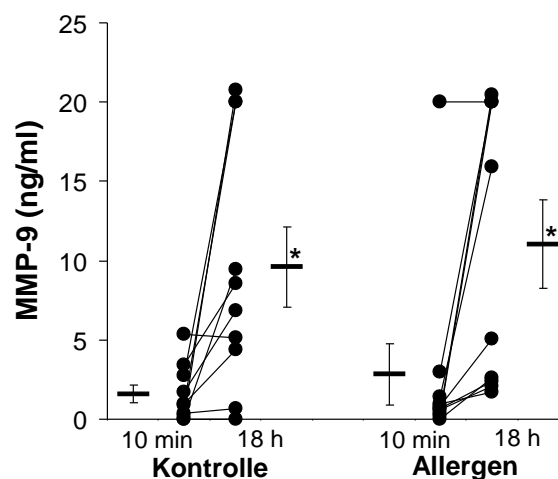


Abbildung 4.18: MMP-9-Expression in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit im Kontroll- und im allergenprovozierten Segment 10 min bzw. 18 h nach segmentaler Allergenprovokation. MMP-9 wurde in zehn voneinander unabhängigen Experimenten per ELISA bestimmt. Neben den Einzelwerten ist zusätzlich die mittlere Konzentration in ng/ml \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ zwischen den Segmenten 18 h nach Provokation und den entsprechenden Segmenten 10 min nach Provokation.

5 Diskussion

CD69 ist ein homodimeres, phosphoryliertes Typ-II-integrales Membranglykoprotein und gehört zur C-Typ-Lektinfamilie⁹⁸. Frühere Synonyme sind „activation/inducer molecule“ (AIM), „early activation antigen 1“ (EA-1), BL-Ac/p26, Leu 23, MLR3, und „very early activation antigen“ (VEA)^{54,173}. Es besteht aus zwei 27 kD bzw. 33 kD großen Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind¹³⁰. Strukturelle Homologien zeigt CD69 im Abschnitt seiner extrazellulären Domäne mit dem T-Zellantigen Ly49, dem „low avidity immunoglobulin E receptor“ (CD23), dem „hepatic asialoglycoprotein receptor“ und CD94/NKG2¹⁴⁷, die als transmembrane Signalrezeptoren in der frühen Phase der Zellaktivierung fungieren⁹⁸. Die strukturelle Verwandtschaft legt auch für CD69 eine Rolle als Rezeptor nahe, wobei diesem vermutlich eine funktionelle Bedeutung für die Zelle zukommt.

Da CD69 auf eosinophilen Granulozyten bisher als Aktivierungsmarker angesehen wird¹⁰⁸, sollte in der vorliegenden Promotionsarbeit seine Bedeutung für die chronische Entzündung am Beispiel des Asthma bronchiale im Hinblick auf die Viabilität der eosinophilen Granulozyten, die die Haupteffektorzellen beim Asthma darstellen, untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten nach Allergenexposition in den Atemwegen um ein Vielfaches akkumulieren und zum größten Teil das Oberflächenantigen CD69 exprimieren, während Zellen aus dem Blut nur nach Stimulation mit Zytokinen CD69-Expression zeigen.

CD69-Engagement auf aktivierten Eosinophilen führte zu den mit einer Apoptose assoziierten Veränderungen, wie „membrane blebbing“ und Fragmentierung des Nukleus.

Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass humane eosinophile Granulozyten das anti-apoptotische Protein *bcl-2* exprimieren. CD69-Engagement veranlasste eine Abnahme der *bcl-2*-Expression.

An der CD69-Signaltransduktion bei eosinophilen Granulozyten ist ferner Caspase-9

beteiligt. Auch das CD95-Signal wird bei Eosinophilen über *bcl-2* vermittelt, dann jedoch über Caspase-8 (Abbildung 5.1).

Zusammengenommen beschreiben, definieren und charakterisieren die in dieser Arbeit dargestellten Experimente das CD69-Antigen als Apoptose-Rezeptor auf humanen eosinophilen Granulozyten. Es ergänzt somit einen anderen bereits bekannten Rezeptor-vermittelten Apoptose-Mechanismus, nämlich den, der mit dem CD95-Antigen assoziiert ist.

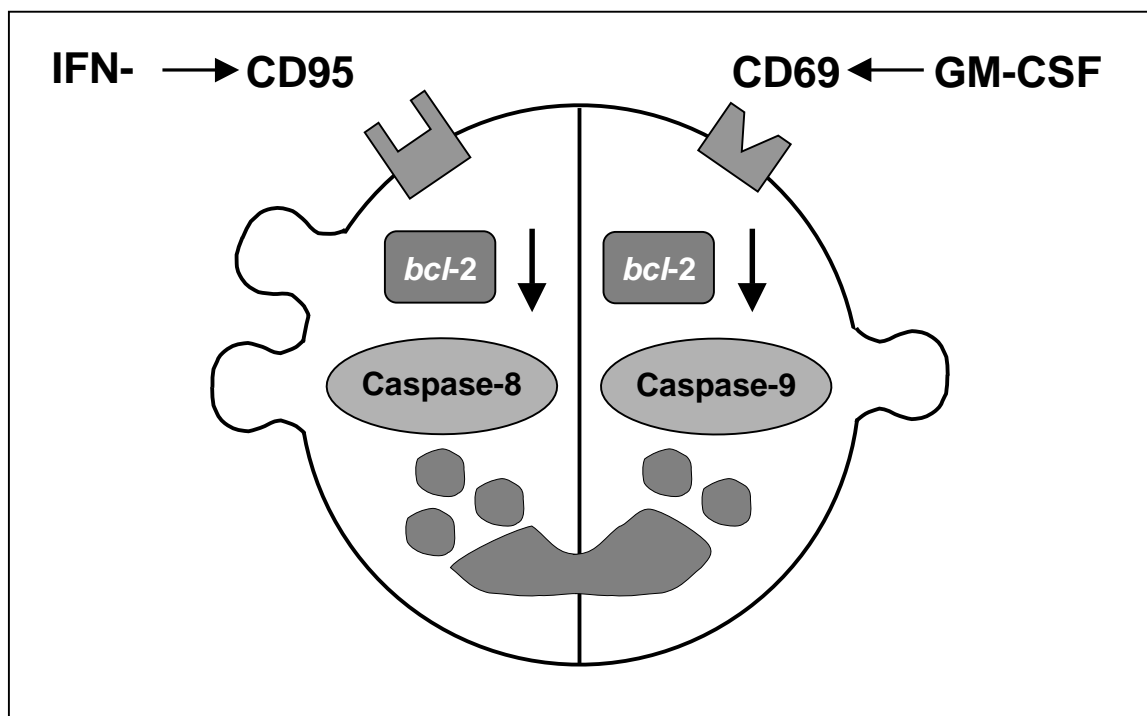


Abbildung 5.1: Zusammenfassende Darstellung der beiden untersuchten Rezeptor-vermittelten Apoptose-Mechanismen beim humanen eosinophilen Granulozyten.

5.1 Das CD69-Oberflächenantigen

5.1.1 CD69-Expression auf Immunzellen

CD69 gilt als ein multifunktionales Antigen, das von einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen exprimiert wird¹⁷³. Es wurde ursprünglich als ein schnell induzierbares T-Zellaktivierungsgen beschrieben⁵⁷, dessen mRNA nach Aktivierung bereits innerhalb von 30 bis 60 Minuten nachweisbar ist¹⁷³. Eine vergleichbar frühe

Expression wurde auch beim eosinophilen Granulozyten beobachtet. Unstimulierte eosinophile Granulozyten aus dem Blut tragen kein immunzytochemisch nachweisbares CD69 auf ihrer Oberfläche, während Eosinophile aus der bronchoalveolären Lavage von Asthmatikern das Antigen exprimieren, wie auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abschnitt 4.12)^{42,58,85,114}. Bei den hier dargestellten Ergebnissen zeigte sich allerdings keine Signifikanz der Erhöhung der CD69-Expression im allergenprovozierten Segment nach 18 h. Die CD69-Expression sinkt sogar bei drei von acht Patienten. Die Erklärung hierfür dürfte in individuellen Unterschieden der Ausprägung des Asthmas liegen. Es gibt zwei Ursachen für Asthma: die Umwelt und genetische Varianten²⁶. So ist es vorstellbar, dass ein Großteil der Asthma-Patienten im Wesentlichen gleich reagiert, während einige Patienten in bestimmten Merkmalen Abweichungen zeigen. Bei der CD69-Expression könnte der zeitliche Ablauf der CD69-Induktion je nach Ursache unterschiedlich sein.

Generell lassen die Befunde zur CD69-Expression vermuten, dass CD69 auf eosinophilen Granulozyten erst während der Migration in die Atemwege induziert wird und daher eine vorausgehende Aktivierung der Zelle anzeigt. Da die CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten eine pro-inflammatorische Umgebung voraussetzt, kann CD69-Expression auf diesen Zellen durchaus als Aktivierungsmarker angesehen werden¹⁰⁸.

Der Begriff „Aktivierungsmarker“ entstammt jedoch der deskriptiven Analyse immunologischer Vorgänge und stellt sicher keine „biologisch sinnvolle“ Bezeichnung dar. Vielmehr stellt die CD69-Expression als phänotypische Veränderung der Zelle einen Aspekt dar, der in der Regel mit einer biologisch begründeten Änderung korrespondiert. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit belegen, dass der Expression des CD69-Antigens auf der Membran eosinophiler Granulozyten eine definierte Funktion zukommt, was im Folgenden diskutiert werden soll.

5.1.2 CD69 als Zelltyp-spezifisches Oberflächenantigen

Auf natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) wird CD69 durch IL-2¹⁵⁸ und IL-12⁴⁹

induziert, während Pentoxifyllin⁷⁰, IL-4⁴⁹ und Leukotoxin¹³⁵ die IL-2-vermittelte Expression von CD69 inhibieren. Neben der Induktion durch Zytokine kann CD69 auch durch Ligation der CD5- oder CD28-Oberflächenantigene auf ruhenden humanen T-Lymphozyten über einen Calcium- und Tyrosinkinase-abhängigen Mechanismus induziert werden¹⁵⁷. Bei neutrophilen Granulozyten wird intrazelluläres CD69 nach Stimulation mit Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (Phorbol-ester, PMA) oder N-Formyl-L-Methyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin (fMLP) bereits innerhalb einer Stunde aus zytoplasmatischen Granula mobilisiert und zur Membranoberfläche transportiert. Diese Translokation lässt sich nicht durch den Peptidsynthese-Hemmer Cycloheximid inhibieren und erfolgt demnach unabhängig von einer *de novo*-Synthese des Proteins⁴⁸.

5.1.3 CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten

T-Helfer-Zellen mit einem Th2-Zytokin-Phänotyp vermitteln die dem Asthma zugrunde liegende allergische Atemwegsreaktion und regulieren die Effektorfunktion des eosinophilen Granulozyten^{27,87,162}. Eosinophile aus der bronchoalveolären Lavage exprimieren CD69, dessen Expressionsdichte im Gegensatz zur CD95-Expression nach endobronchialer Allergenexposition weiter zunimmt⁸⁵.

In vitro lässt sich die CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten durch Ionomycin, Phorbol-ester, IL-3, IL-5, GM-CSF und IFN- γ stimulieren^{58,99}. Im Gegensatz zu Neutrophilen wird die Expression von CD69 auf eosinophilen Granulozyten durch Cycloheximid gehemmt⁵⁸, was auf eine *de novo*-Proteinsynthese von CD69 zu diesem Zweck von Eosinophilen schließen lässt. Die Untersuchung des Sekretionsmechanismus ergab, dass eine Zytokin-Stimulation nicht nur zu einer vermehrten CD69-mRNA-Expression führt, sondern gleichzeitig die Menge des intrazellulär gespeicherten CD69-Proteins reduziert⁹⁹. Der Expression von CD69 durch eosinophile Granulozyten dürfte daher sowohl eine Mobilisierung des Moleküls aus intrazellulären Speichern als auch eine *de novo*-Proteinsynthese zugrunde liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die *in vitro*-Experimente zur Stimulation der

CD69-Expression GM-CSF benutzt, da dieses Zytokin beim Asthma bronchiale für die Viabilität der eosinophilen Granulozyten eine größere Rolle spielt als die beiden anderen wesentlichen Aktivatoren Eosinophiler, IL-3 und IL-5¹²¹. Durch Stimulation mit GM-CSF konnte eine deutliche CD69-Expression erzielt werden (Abschnitt 4.3). Ebenso wurde mit dem Th1-Typ-Zytokin IFN- γ eine CD69 -Expression erreicht, die jedoch weniger als die Hälfte der GM-CSF-induzierten Expression betrug (Abschnitt 4.1).

5.1.4 CD69 als Aktivierungsmarker auf eosinophilen Granulozyten

Die Funktion des CD69-Oberflächenantigens auf eosinophilen Granulozyten ist derzeit noch ungenügend verstanden. Die Stimulation eosinophiler Granulozyten mit IL-3, IL-4, IL-5 bzw. GM-CSF führt neben einer Induktion der CD69-Expression ebenso zu einer Erhöhung der Viabilität der Zellen. Es konnte ferner gezeigt werden, dass auch IL-13 sowohl CD69 induzieren als auch die Viabilität eosinophiler Granulozyten steigern kann^{43,99}. Dies ist von besonderem Interesse, da IL-13 wie auch IL-4 zu den Th2-Typ-Zytokinen gehört und für die IgE-vermittelte allergische Reaktion von großer Bedeutung ist. Darüber hinaus induziert IL-13 CD69 nur auf den eosinophilen Granulozyten, nicht aber auf neutrophilen Granulozyten⁹⁹, eine Beobachtung, die insbesondere für die Pathogenese Eosinophilen- versus Neutrophilen-dominierten Immunreaktionen wichtig sein kann, wie z.B. beim Asthma bronchiale bzw. bei der chronisch-obstruktiven Bronchitis (COPD). Zusammengenommen legen diese Daten eine Rolle des CD69-Antigens bei der Regulation der zellulären Überlebenszeit nahe.

Das unspezifische oder angeborene Immunsystem spielt eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und unmittelbaren Reaktion auf eindringende Pathogene. In diesem Zusammenhang wurde eine große Zahl sogenannter „Muster-Erkennungs-Moleküle“ identifiziert. Solche „Muster-Erkennungs-Moleküle“ dienen nicht nur der Elimination von Pathogenen, sondern auch der Entfernung apoptotischer Zellen¹²⁷. Zu diesen Molekülen zählen u.a. membrangebundene Rezeptoren, wie z.B. aus der Familie der C-Typ-Lektine, zu denen auch CD69 gehört. Aus diesem Grund kommt CD69 auf eosinophilen Granulozyten möglicherweise primär eine Rolle zur Elimination dieser

Zellen bei der Terminierung der Eosinophilen-assoziierten Entzündung durch Apoptose zu. Da durch eine Fehlregulation beim Asthma bronchiale und anderen chronischen Entzündungsprozessen eine Verschiebung des Zytokinexpressionsmuster zum Th2-Typ hin erfolgt, kommt es zu einer Einwanderung der eosinophilen Granulozyten in das betroffene Gewebe und zu ihrer Aktivierung. Die natürliche Begrenzung dieser Reaktion findet aber nicht oder nur unzureichend statt, was eine „chronische“ Entzündung zur Folge hat.

CD69 scheint also auf eosinophilen Granulozyten an der Regulation der Viabilität über die Induktion der Apoptose beteiligt zu sein^{42,43,164}. Da CD69 ausschließlich auf aktivierten Eosinophilen exprimiert wird, könnten Therapien, die auf diesem Oberflächenantigen basieren, einen Vorteil gegenüber CD95-basierenden Ansätzen haben. Denn CD95 wird auch auf Zellen in physiologischem, nicht entzündlichem Milieu exprimiert.

5.1.5 CD69-vermittelte Funktionen und Signaltransduktion

Diese oben dargestellten Zelltyp-spezifischen Unterschiede im Expressionsmechanismus lassen den Schluss zu, dass CD69 auf unterschiedliche Weise reguliert wird und je nach Zelltyp verschiedene Funktionen erfüllt. Bei eosinophilen Granulozyten wurde gezeigt, dass CD69 eine Apoptose induzieren kann¹⁶⁴. Der zugrunde liegende Signaltransduktionsmechanismus ist jedoch noch nicht beschrieben worden. Auch die Beziehung des CD69-vermittelten Signals zu anderen Apoptosesignalen wurde bisher nicht dargestellt.

Ebenso wie beim Mechanismus der Expression, finden sich Zelltyp-spezifische Unterschiede der CD69-vermittelten Funktion. So führt beispielsweise die Kreuzvernetzung von CD69 auf Thrombozyten zur Aggregation¹⁴⁹ und Aktivierung der PLA₂¹⁵⁰, auf Monozyten zur NO-Produktionssteigerung und Aktivierung der Zytotoxizität³², in Neutrophilen zur Lysozymfreisetzung⁴⁸, auf NK-Zellen zur Zytotoxizitätsauslösung und Proliferation^{14,76,107} und in T-Lymphozyten zur Zytokinproduktion^{19,29,50,112,131}. Bei B-Lymphozyten vermittelt die Kreuzvernetzung von CD69-Antigenen nach Exposition mit PMA oder anti-IgM-Antikörpern eine

Proliferationsverstärkung^{126,129}. Im Gegensatz hierzu stehen die Beobachtungen an Monozyten, bei denen anti-CD69-Antikörper eine Apoptose induzieren, allerdings erst nach vorausgegangener Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation¹²⁵.

Phorbol-ester-stimulierte T-Lymphozyten sezernieren nach Zugabe von anti-CD69-Antikörper TNF- α ¹³¹ mit deutlicher Erhöhung der Bindungsaktivität des Aktivatorprotein-1 (AP-1) an das Phorbol-Ester-Response-Element¹⁵⁵. Ein CD69-vermitteltes Signal kann aber auch die Bindungsaktivität von NFAT und AP-1 nach PMA- und Ionomycin-Stimulation in peripheren T-Lymphozyten erhöhen²⁹. Die CD69-vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen ist von der Aktivierung von Src-Familie Tyrosin-Kinasen und Syk sowie von der „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK), die zur MAPK-Familie gehört, abhängig^{123,174}.

Die Transduktion des durch CD69 vermittelten Signals bei durch LPS vorstimulierten Monozyten erfolgt vermutlich durch ein G-Protein, worauf eine bestehende Sensitivität gegenüber Pertussis-Toxin schließen lässt¹²⁵. An der Signaltransduktion könnte auch die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) γ beteiligt sein, die im Gegensatz zu anderen PI3K durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine aktiviert wird¹⁴¹, und wie auch andere PI3K an vielen zellulären Funktionen wie Proliferation, Migration, Organisation des Zytoskeletts und Regulation der Apoptose beteiligt ist¹⁶⁹. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels PI3K-Inhibitoren keine Beteiligung der PI3K an der CD69-vermittelten Signalweiterleitung nachgewiesen werden. Die CD95-vermittelte Viabilitätsreduktion konnte im Gegensatz dazu durch diese Inhibitoren verstärkt werden (Abschnitt 4.9). Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine Beteiligung der PI3K an der CD95-Signalweiterleitung in eosinophilen Granulozyten. Für CD4⁺-T-Zellen CD28-defizienter Mäuse konnte eine erhöhte Empfänglichkeit für CD95-vermittelte Apoptose über einen PI3K-abhängigen Signalweg gezeigt werden⁷¹. Dabei ist die Protein-Kinase B (PKB/Akt1) eine wichtige Serin/Threonin-Kinase, die das Überleben der Zellen „downstream“ des PI3K-Signals fördert. Für eosinophile Granulozyten lässt sich nun auch eine zumindest teilweise Antagonisierung des CD95-Signals durch den PI3K/PKB-Signalweg postulieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun, dass CD69-Engagement in

aktivierten humanen eosinophilen Granulozyten eine Apoptose induziert. Diese geht mit charakteristischen Veränderungen einher, zu denen beispielsweise „membrane blebbing“ oder die Fragmentierung des Nukleus gehören.

Womit könnte die Multifunktionalität des CD69 im Zusammenhang stehen? Die Vielfalt der Funktionen von CD69 ist möglicherweise auf die intrazelluläre Domäne zurückzuführen, die mit 40 Aminosäuren allein zu kurz ist, um eine Weiterleitung des Signals zu bewirken. Daher kann eine Assoziation mit je nach Zelltyp unterschiedlichen Proteinen zu einer Zelltyp-spezifischen Reaktion führen. Die Funktion des CD69 auf eosinophilen Granulozyten ist jedoch noch nicht hinreichend untersucht.

Der Rezeptor-proximale Signalweg wurde hier nicht dargestellt, jedoch konnte gezeigt werden, dass das CD69-vermittelte Signal weiter distal über *bcl-2* und Caspase-9 verläuft. Diese Beobachtungen sprechen für einen mitochondrialen Signalweg (vergleiche Abschnitt 5.5.4, Abbildung 5.4, und Abschnitt 5.5.5) und unterstützen die Vermutung, dass CD69 im Gegensatz zu CD95, mit seiner „starren“ Signalweiterleitung, eine je nach Zelltyp flexible Signaltransduktion vermittelt und weniger spezialisierte Rezeptor-proximale Proteine nutzt.

5.2 Todesliganden

Todesliganden sind körpereigene Proteine der TNF-Familie. Das am längsten bekannte und namensgebende Mitglied, TNF- α , spielt als Zytokin im Verlauf von Entzündungsprozessen, wie beispielsweise der Sepsis, eine wichtige Rolle. 1989 wurden voneinander unabhängig von zwei Arbeitsgruppen^{66,153} Antikörper entdeckt, die in lymphoiden Zellen und Tumorzellen verschiedenen Ursprungs Apoptose auslösen und deren Antigen ursprünglich als Apo-1 bezeichnet wurde. Dieser Antikörper stimuliert den membranständigen Rezeptor CD95 (Apo-1/Fas), dessen natürlicher Ligand, der CD95-Ligand (CD95L, FasL), vor allem von Lymphozyten gebildet wird.

In der Zwischenzeit ist bekannt, dass das CD95-System eine zentrale Rolle bei der

Reifung von T-Lymphozyten im Thymus, der Beendigung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort und bei Autoimmunreaktionen spielt. Auf Grund der im Tierversuch beobachteten toxischen Wirkung von Apo-1 auf die Leber ist eine therapeutische Anwendung des CD95-Systems nicht möglich.

Im Jahr 1995 wurde ein weiteres Mitglied dieser Familie entdeckt, der TNF-verwandte (related) apoptoseinduzierende Ligand (TRAIL), der auf Tumorzellen von ektodermaler Herkunft effektiv Apoptose auslöst. Seine physiologische Funktion ist allerdings bislang unklar. TRAIL ist im Tierversuch weniger toxisch als CD95 und könnte in Zukunft z.B. bei der Behandlung von Malignomen Anwendung finden. Weitere Mitglieder der TNF-Familie (Apo-3L, TWEAK) besitzen eine geringere Apoptose-induzierende Wirkung. Mitglieder der TNF-Familie vermitteln neben der Induktion einer Apoptose weitere Funktionen, deren Signalweg z.B. den Transkriptionsfaktor „Nukleärer Faktor für die κ -Kette B“ (NF κ B) beinhaltet, und zu erhöhter Viabilität und Proliferation führen.

5.3 Das CD95-Oberflächenantigen (Apo-1, Fas)

5.3.1 CD95-Expression auf Immunzellen

CD95 ist ein Typ-I-integrales Transmembranprotein mit 45 kDa Molekulargewicht, das ursprünglich durch monoklonale Antikörper identifiziert wurde, die nach Bindung an bestimmte Tumorzellen Apoptose auslösen. CD95 gehört zur Superfamilie der Tumor Necrosis Factor (TNF)-/Nerve Growth Factor (NGF)-Rezeptoren^{66,118,153} und ist der bisher am besten untersuchte Todesrezeptor. Der CD95-Rezeptor wird von aktivierten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert^{31,60,67,82,102,106,119}. Das Engagement des CD95-Rezeptors durch anti-CD95-Antikörper bzw. durch den CD95-Liganden (CD95L) führt zu einer Apoptose, wenn auch nicht in allen Zelltypen^{24,111}. So ist die CD95-assoziierte Apoptose beispielsweise bei der Elimination „unerwünschter“ Lymphozytenklone für die Feinregulation bzw. Funktion des Immunsystems von Bedeutung⁸³. Die immunologische Relevanz des Rezeptors wird an Tiermodellen deutlich, denen aufgrund eines homozygoten *lpr*- oder *gld*-Allels der funktionelle CD95-Rezeptor bzw. sein Ligand fehlt. Mäuse dieses

Genotyps reichern eine große Anzahl nicht-maligner CD4⁺/CD8⁺-Lymphozyten in der Milz an und entwickeln Autoimmunkrankheiten^{144,166}. Der Funktionsverlust der lpr- bzw. gld-Phänotypen deutet darauf hin, dass CD95 eine wesentliche Rolle bei der Regulation einer normalen Immunantwort und bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz spielt. Zudem liefern molekularbiologische Studien Hinweise darauf, dass CD95 der Mediator des Aktivierungs-induzierten Zelltodes („activation induced cell death“, AICD) ist, einer Form der Apoptose, die für die Terminierung einer Immunantwort verantwortlich ist^{16,34,72}.

Der mit dem CD95-Rezeptor korrespondierende Ligand, CD95L, ist ein Typ-II-integrales Membranprotein, das Homologien zu TNF- α aufweist¹⁴³ und auf aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird^{5,55,142}. CD95L kommt aber auch in einer löslichen Form (sCD95L) vor, die vergleichbar dem TNF- α über extrazelluläre Prozessierung durch Metalloproteinasen freigesetzt wird^{78,146}. Die hier wirkenden Regulationsmechanismen sind jedoch noch unbekannt.

Die Aggregation von CD95-Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch einen anti-CD95-Antikörper oder durch den trimeren CD95-Liganden überführt die intrazellulären „death domains“ (DD) der Rezeptoren in eine Konformation, die eine Assoziation mit Adaptorproteinen ermöglicht. So bindet die DD des CD95R an die des „Fas associated protein with a DD“ (FADD). FADD enthält eine „death effector domain“ (DED), die die zymogene Form der Initiator-Caspase-8 (FLICE/Mach α 1) durch Entfernen der DED-homologen Region aktiviert, und so über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade zur Apoptose führt^{10,22,110} (Abbildung 5.2). Ein vergleichbarer Vorgang wurde auch für den TNF-Rezeptor-1 (TNF-R1) beschrieben⁶³.

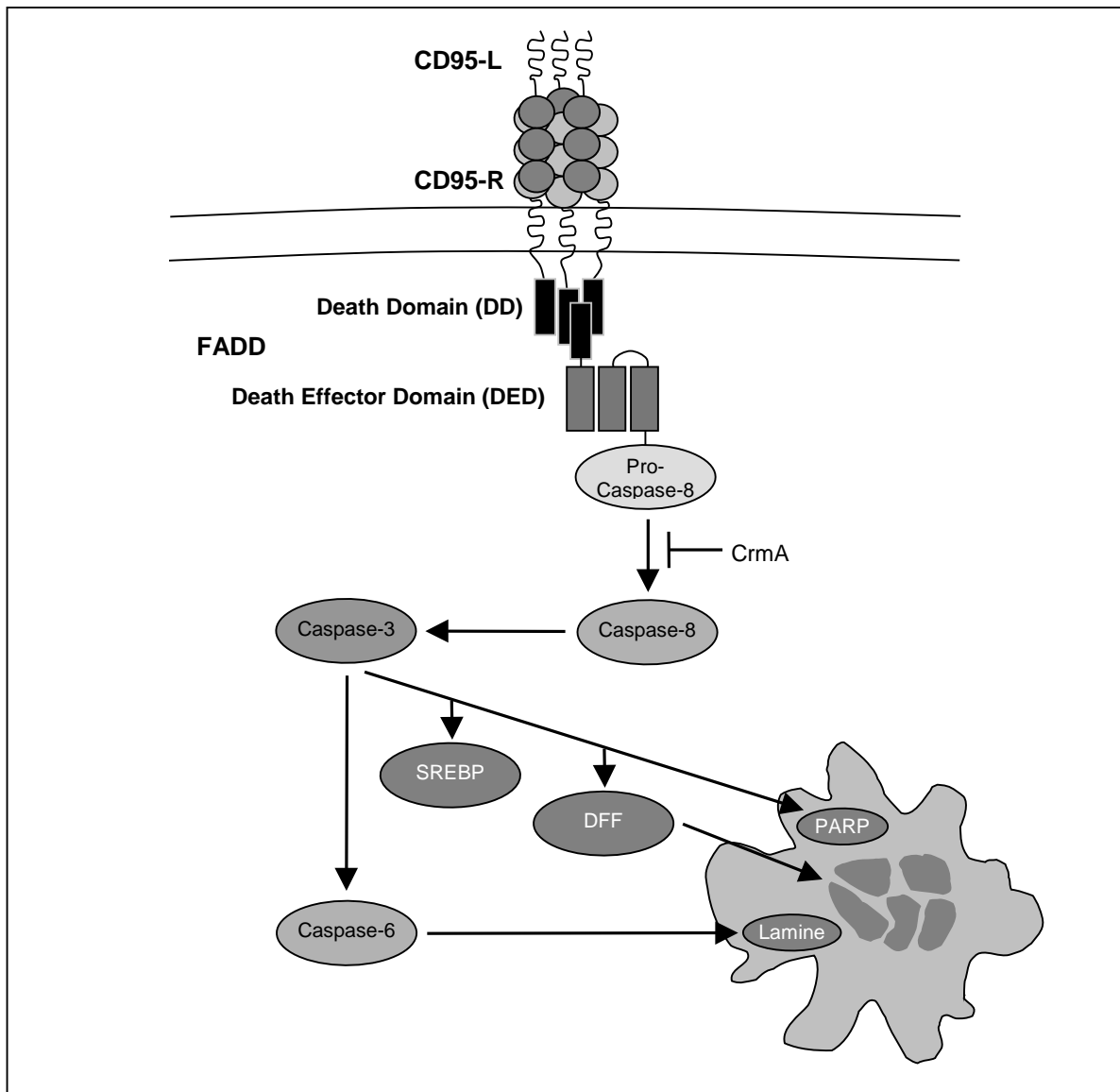


Abbildung 5.2: Schema des CD95-assoziierten Signalwegs.

Quellen:

- ³⁸ Earnshaw, W.C., et al., Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.*, **68**, 383-424 (1999).
- ³ Adrain, C., and Martin, S.J., The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 390-397 (2001).

Die Applikation von anti-CD95-Antikörpern zur Apoptose-Induktion ist grundsätzlich möglich und *in vivo* durchführbar. So reduziert die Gabe von anti-CD95-Antikörpern beispielsweise die Anzahl der Eosinophilen in Ovalbumin (OVA)-sensibilisierten Mäusen¹⁵⁴. In einem anderen Mausmodell führt die inhalative Gabe eines aerosolisierten anti-CD95-Antikörpers zur Apoptose bronchialer und alveolärer Epithelzellen. Das mag erklären, warum sich nach einer gewissen Latenz eine fortschreitende Lungenfibrose entwickelte⁵³. Diese Beobachtungen zeigen zunächst, dass sich die Apoptose eosinophiler Granulozyten durch das Engagement bestimmter Oberflächenrezeptoren nach Applikation des korrespondierenden Liganden beeinflussen lässt. Die Ergebnisse machen aber auch deutlich, dass CD95L über die Zielzelle hinaus noch andere Zellen anspricht, die immunologische Homöostase stört und damit erhebliche Nebenwirkungen hervorruft. Die Ursache hierfür dürfte in der ubiquitären Expression des CD95-Antigens auf nahezu allen Zelltypen liegen, die ebenfalls mit dem CD95L interagieren. Aus diesem Grund ist es für einen therapeutischen Ansatz erforderlich, spezifische Apoptose-auslösende Rezeptoren zu identifizieren, die exklusiv einzelne oder nur wenige Zelltypen adressieren.

5.3.2 CD95-Expression auf eosinophilen Granulozyten

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Eosinophile CD95 konstitutiv auf einem niedrigen basalen Niveau exprimieren^{60,102} und dass die Ligation von CD95 mit einem antagonistischen Antikörper zur Apoptose dieser Zellen führt¹⁰². Über die differenzielle CD95-Regulation auf Eosinophilen ist bislang allerdings nur wenig bekannt. Auf unstimulierten eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut wird CD95 nur schwach konstitutiv exprimiert¹⁰⁰. In gleicher Weise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Eosinophile aus dem Blut und der BAL von Asthmatikern nur eine geringe CD95-Expression aufweisen (Abschnitt 4.12). Auch nach Allergenprovokation bleibt die Dichte der CD95-Expression unverändert⁸⁵. Selbst eine Stimulation eosinophiler Granulozyten *in vitro* mit den etablierten Eosinophilen-aktivierenden Th2-Typ-Zytokinen IL-3, IL-5 und GM-CSF oder mit Kortikosteroiden beeinflusst die CD95-Expression nicht. Allerdings führen TNF- α und das Th1-Typ-Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) zu einer erhöhten Oberflächenexpression des

CD95-Rezeptors, die durch IL-3, IL-5 bzw. GM-CSF wieder reduziert werden kann¹⁰⁰. Da sowohl IFN- γ als auch TNF- α während der asthmatischen Entzündung nicht freigesetzt werden⁸⁵, dürfte die CD95 vermittelte Apoptose eosinophiler Granulozyten im Rahmen der asthmatischen Entzündung nicht stattfinden, oder, im übertragenen Sinne, „ausgeschaltet“ sein. Die Hemmung der CD95-Expression auf Eosinophilen scheint deshalb zur Akkumulation der eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen beizutragen, was das Krankheitsbild bei verschiedenen Th1-Typ- oder Th2-Typ-assoziierten Erkrankungen bestimmen dürfte (Abbildung 5.3).

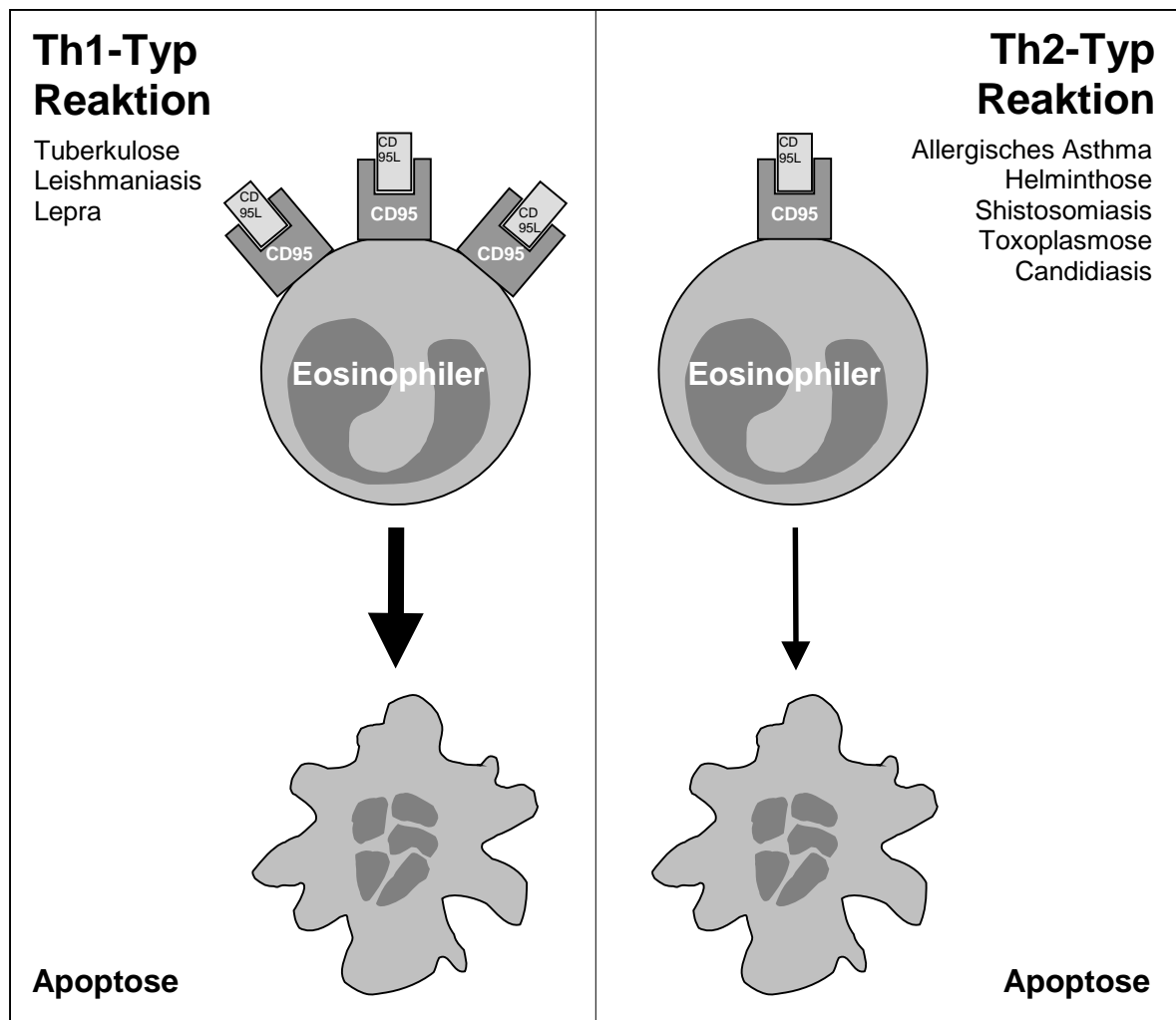


Abbildung 5.3: Regulation der Apoptose eosinophiler Granulozyten über den CD95-Rezeptor unter dem Einfluss eines Th1- bzw. Th2-Immunmusters.

5.4 Vergleich der Funktion von CD69 und CD95 bei humanen eosinophilen Granulozyten

CD69 sowie CD95 sind auf Leukozyten ubiquitär vorkommende Oberflächenantigene. Davon abgesehen weisen sie jedoch einige grundsätzliche Unterschiede auf. Ein wesentlicher differierender Aspekt zwischen beiden Antigenen bei eosinophilen Granulozyten ist ihr Expressionsverhalten. Während CD95 konstitutiv exprimiert wird, ist CD69 auf naiven Zellen nicht nachweisbar (Abschnitt 4.1). Bei einer Aktivierung der Eosinophilen durch die Zytokine GM-CSF, IL-3 bzw. IL-5 wird CD69 induziert. Dabei handelt es sich um Zytokine, die bei der Pathogenese Th2-Zell-dirigierter, Eosinophilen-assoziiierter Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale eine wesentliche Rolle spielen. Im Hinblick auf die Expression des CD95-Rezeptors bleibt die Aktivierung jedoch ohne Einfluss (Tabelle 5.1).

Ein zweiter Unterschied liegt in der Struktur der Rezeptoren. Beim CD95-Rezeptor wird der intrazelluläre Signalweg durch die intrazelluläre Domäne bestimmt. Seine Funktion ist daher bei allen Zelltypen auf die Induktion einer Apoptose begrenzt. CD69 ist wegen des Fehlens einer intrazellulären Domäne, die selbst Signaltransduktionsfunktion übernehmen kann, dagegen nicht auf eine Funktion festgelegt und kann daher in verschiedenen Zelltypen durch Interaktion mit unterschiedlichen Adaptorproteinen Zelltyp-spezifische Aufgaben übernehmen, wie für Monozyten/Makrophagen (mit LPS als Kostimulus: Apoptose-Induktion ¹²⁵), Lymphozyten (Proliferationsinduktion ²⁰) und Neutrophile (Granula-Exozytose ⁴⁸) gezeigt wurde. Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente (Abschnitt 4.4) beweisen, dass der Rezeptor beim Eosinophilen eine Rolle bei der Apoptoseinduktion und damit bei der Regulation der Viabilität eosinophiler Granulozyten übernimmt (Tabelle 5.1). Die zentrale Rolle des eosinophilen Granulozyten bei der Pathogenese des Asthmas legt die Vermutung nahe, dass bei dieser Krankheit diese Funktion gestört ist. Wo und in welcher Form diese Störung vorliegt, ist jedoch noch nicht bekannt.

Tabelle 5.1: Gegenüberstellung der Eigenschaften, Struktur und Funktion der Apoptose-Rezeptoren CD95 und CD69.

| Kriterien | CD95 | CD69 |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Ligand | CD95L | nicht bekannt |
| Vorkommen | ubiquitär | ubiquitär |
| Naive Eosinophile | + | - |
| Aktivierte Eosinophile | + | +++ |
| Funktion | Apoptose | Zelltyp-spezifisch |
| Expressionsinduktoren | TNF- α , IFN- γ | GM-CSF, IL-3, IL-5, IFN- γ |
| Signaltransduktion | Death-Domain (DD)-tragende Proteine | G-Protein ??? |

5.5 Vergleich der Signalwege der CD69- oder CD95-vermittelten Apoptose in eosinophilen Granulozyten

5.5.1 CD69 als Zelltyp-spezifischer Apoptose-Induktor

Die hier präsentierten Daten stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Lymphozyten, bei denen CD69 als Co-Aktivator dient, und zeigen, dass CD69 in eosinophilen Granulozyten ein zur Apoptose führendes Todessignal induziert. Es gibt mehrere Möglichkeiten, Apoptose nachzuweisen und keine allein ist ausreichend für einen eindeutigen Beweis der Apoptose. Eine Apoptose kann angenommen werden, wenn einige korrespondierende zelluläre und subzelluläre Veränderungen in Kombination beobachtet werden. Wie hier gezeigt wurde, deutet (1) die durch anti-CD69-mAk-induzierte Fragmentierung der DNA und des Nukleus (Abschnitt 4.4, Abbildung 4.6, 4.7), (2) das „membrane blebbing“ (Abschnitt 4.4, Abbildung 4.6) und (3) die *bcl-2*-Herunterregulation (Abschnitt 4.6, Abbildung 4.9, 4.10) darauf hin, dass die durch CD69-Ligation reduzierte Überlebenszeit der eosinophilen Granulozyten tatsächlich auf Apoptose beruht.

Die Beobachtung, dass humane bronchoalveoläre Eosinophile zusätzlich zur Expression von CD95 auch den funktionellen CD69-Rezeptor exprimieren, lässt vermuten, dass der Rezeptor an der Regulation entzündlicher Krankheiten beteiligt ist. Es gibt allerdings eine Anzahl signifikanter Unterschiede zwischen CD69- und CD95-vermittelter Apoptose. Am bedeutendsten dabei ist, dass CD95 in fast allen

Zelltypen Apoptose induziert, während CD69 selektiv nur bei aktivierten Eosinophilen^{42,164} und Monozyten¹²⁵ zur Apoptose führt. Außerdem tragen naive Blut-Eosinophile kein CD69-Antigen auf ihrer Oberfläche, während das CD95-Antigen auf den Zellen konstitutiv exprimiert wird.

Diese Beobachtung hebt noch einen anderen wichtigen Aspekt hervor. Können Zellen, wie der eosinophile Granulozyt, in Abhängigkeit von der Expression des CD95-Liganden zur Apoptose veranlasst werden, setzt die CD69-vermittelte Apoptose eine Aktivierung der Zelle voraus. Dieser Mechanismus erlaubt eine fein austarierte Balance zwischen Aktivierung und Inhibition, die den Organismus vor einem progressiv fortschreitenden und letztlich selbstzerstörerischen Entzündungsprozess schützt.

5.5.2 Intrazelluläre Signaltransduktion

Die Liganden der TNF-Familie lösen Apoptose aus, indem sie mit ihrem jeweiligen spezifischen Rezeptor in Kontakt treten und diesen besetzen. Für TNF- α ist der korrespondierende Apoptose-vermittelnde Rezeptor TNF-RI, für CD95L ist dies der CD95R. Für TRAIL, einen weiteren Apoptose-Induktor dieser Familie, sind zwei verschiedene Apoptose-vermittelnde Rezeptoren bekannt, die als TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) bezeichnet werden.

Zur Apoptose-Induktion einer Zelle legen sich mindestens drei Ligandenproteine zu einem Trimer zusammen, was an der Zellmembran zu einer Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors nach Bindung der Liganden führt. Entsteht ein Rezeptortrimer an der Zelloberfläche, so führt dies zur Anlagerung sogenannter Adaptormoleküle, FADD oder TRADD, an der für Todesrezeptoren charakteristischen Todesdomäne.

Im Verlauf der Signalkaskade im Intrazellulärraum spielen die Mitochondrien eine wichtige Rolle. In der frühen Apoptose verringert sich das Membranpotenzial der Mitochondrien ($\Delta\Psi$) und es wird Cytochrom c sowie der apoptoseinduzierende Faktor (AIF) freigesetzt. Es ist bemerkenswert, dass hierbei

Proteine der Atmungskette eine Rolle spielen, die für den Energiehaushalt verantwortlich sind. Cytochrom c aktiviert „apoptotic protease activating factor 1“ (Apaf-1), das Homolog zu ced-4 von *C. elegans*.

5.5.3 Regulatorische Proteine des Apoptosesignalwegs

Verschiedene Klassen von Proteinen regulieren die mit Apoptose in Zusammenhang stehenden Faktoren („Apoptoseapparat“). Zum Beispiel verhindern beim CD95-vermittelten Signalweg FLICE-inhibierende Proteine (FLIP) die Aktivierung von FLICE (Caspase-8). Mitglieder der *bcl-2* Familie sind in den Membranen der Mitochondrien lokalisiert und können die Apoptose fördern oder hemmen (siehe Abschnitt 5.5.5). *Bcl-2* besitzt eine weitgehende Homologie mit den apoptoseinhibierenden Proteinen ced-9 von *C. elegans*. Die Inhibitoren von Apoptose (IAP) greifen an einem noch nicht definierten, distalen Abschnitt der Signalkaskade an, eventuell bei den Caspasen. Ein Beispiel aus der Natur soll diesen Aspekt verdeutlichen. So haben Viren verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Apoptose der von ihnen infizierten Wirtszellen zu verhindern. Sie besitzen z.B. Zytokinantagonisten, virales FLIP oder einen Hemmstoff für Caspasen (crmA). Solche Mechanismen sind bei eosinophilen Granulozyten im Rahmen der Entzündung nicht bekannt. Man könnte sich jedoch vorstellen, dass bei Infekt-assoziierten Asthmaformen Viren die Apoptose eosinophiler Granulozyten in gleicher Form hemmen.

Nicht-Rezeptor-abhängige Apoptose-Induktoren stoßen den intrazellulären Apoptosesignaltransduktionsweg wie z.B. Betulinsäure direkt an den Mitochondrien an⁴⁶. Abhängig von Zelltyp und Trigger sind dabei einzelne Elemente der Apoptosesignalkaskade überflüssig. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass CD95L in einigen leukämischen Zellen unter Umgehung der Mitochondrien über Interaktion von Caspase-8 mit Caspase-3 Apoptose auslöst. In anderen Zelltypen (siehe Abschnitt 5.5.4) bildet der Weg über die Mitochondrien für die effektive Induktion der Apoptose durch CD95L eine wesentliche Voraussetzung¹³³.

Obwohl das Modell der einfachen Signalkaskade für das Verständnis der

intrazellulären Prozesse hilfreich ist, stellt die Kaskade nur eine grobe Simplifizierung des eher hochkomplexen Zusammenspiels zwischen Proteinen der Signalkaskade und den regulatorischen Proteinen dar. Die intrazellulären Prozesse entsprechen dabei wohl einem komplexen Gleichgewicht, das von vielen Faktoren abhängt. So beeinflussen beispielsweise p53 und die Stresskinasen und -Phosphatasen (MAPK, JNK) die Apoptosesensitivität, teilweise über transkriptionelle Regulation, welche allerdings im Detail derzeit nur unzureichend verstanden ist.

5.5.4 Rolle von *bcl-2* bei der Regulation des Überlebens und der Apoptose eosinophiler Granulozyten

Das erste Säugetierhomolog zu *ced-9* bei *C.elegans* wurde 1988 als „B-cell leukemia/lymphoma 2“ (*bcl-2*) beschrieben und ist in B-Zelllymphomen involviert ¹⁵⁹. *Bcl-2* verwandte Proteine enthalten mindestens eine von vier konservierten Domänen (BH 1-4). Sie sind entweder pro- oder anti-apoptotisch und regulieren das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellwachstum. So blockiert z.B. *bax* die anti-apoptotische Wirkung von *bcl-2*, indem es mit ihm Heterodimere bildet ².

Die *bcl-2* verwandten Proteine agieren als eine Art Kontrollpunkt und regulieren die Caspasen bzw. die mitochondriale Membranintegrität. Modelle, in denen die Funktion von *bcl-2* intensiviert oder aber blockiert wurde, zeigen, dass *bcl-2* eine jeweils dem Stadium der Zellentwicklung entsprechende spezifische Rolle spielt. Diese ist ein entscheidender Parameter der zellautonomen Koordination zur Darstellung der beiden entgegengesetzt verlaufenden Signalwege zwischen Zellwachstum und Zelltod ¹³.

Einen schematischen Überblick über die Signalwege der Familie der *bcl-2*-Proteine gibt die Abbildung 5.4.

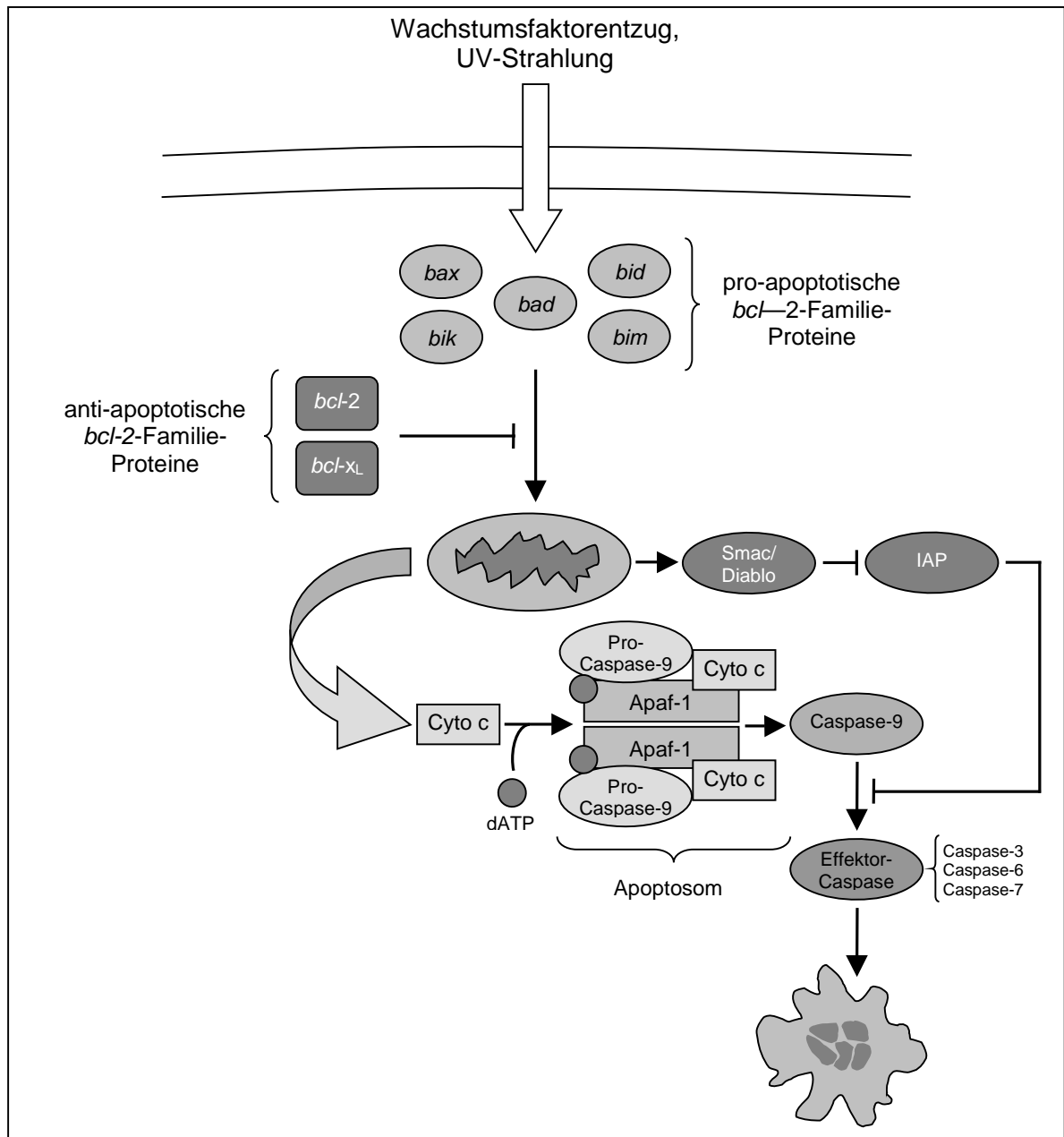


Abbildung 5.4: Schematischer Überblick über die Signalwege der Familie der *bcl-2*-Proteine wie sie vermutlich auch im eosinophilen Granulozyten umgesetzt ist.

Quellen:

- ⁷⁹ Kelekar, A., and Thompson, C.B., *Bcl-2*-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. Trends Cell. Biol., **8**, 324-330 (1998).
- ¹²⁴ Priault, M., et al., Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria: permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. Eur. J. Biochem., **260**, 684-691 (1999).
- ¹⁰³ McDonnell, J.M., et al., Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. Cell, **96**, 625-634 (1999).

Die Rolle des anti-apoptotischen *bcl-2* bei eosinophilen Granulozyten ist trotz mehrerer Studien zu diesem Thema immer noch unklar. In Blut-Eosinophilen konnten einige Arbeitsgruppen das *bcl-2*-Protein nicht nachweisen^{35,172}, während andere wie auch in der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 4.6), z.T. nach Stimulation, das *bcl-2*-Protein identifizieren konnten^{33,42,117,128,171} (Tabelle 5.2). Diese gegensätzlichen Ergebnisse dürften durch unterschiedliche Nachweismethoden, Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und unterschiedlichem Primingstatus der Eosinophilen entstanden sein⁸⁴.

In dieser Arbeit konnte *bcl-2* in allen Präparationen aus dem peripheren Blut mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abschnitt 4.6). Diese Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse von Jang⁶⁸, Dewson³³, Vignola¹⁶⁰, Druilhe^{36,37}, Yasui¹⁷¹, Saita¹²⁸ und Ochiai¹¹⁷ und legen nahe, dass *bcl-2* bei der Regulation der Viabilität des eosinophilen Granulozyten eine Rolle spielt.

Tabelle 5.2: Gegenüberstellung der publizierten Beobachtungen zur *bcl-2*-Expression in humanen eosinophilen Granulozyten

| | mRNA | Protein | Herkunft der Eosinophilen |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Jang 2000 ⁶⁸ | | + | Sputum |
| Zangrilli 2000 ¹⁷² | | - | Peripheres Blut |
| Dewson 1999 ³³ | -/+ (IL-5) | -/+ (IL-5) | Peripheres Blut |
| Vignola 1999 ¹⁶⁰ | | + | Bronchial-Biopsien |
| Dibbert 1998 ³⁵ | -(Kontrolle, GM, IL-5) | -(Kontrolle, GM, IL-5) | Peripheres Blut |
| Druilhe 1998 (1) ³⁷ | | + | Bronchial-Biopsien |
| Druilhe 1998 (2) ³⁶ | | +(NS) | Peripheres Blut/ Nabelschnur |
| Yasui 1997 ¹⁷¹ | | +(Theophylline) | Peripheres Blut |
| Saita 1997 ¹²⁸ | | + | Peripheres Blut/ BAL(CEP) |
| Ochiai 1997 ¹¹⁷ | +(IL-5) | +(IL-5) | Peripheres Blut |

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass die *bcl-2*-Proteinexpression in den Zellen nach Engagement des CD69-Rezeptors reduziert wird. Zusammen mit der Beteiligung der Caspase-9 (siehe Abschnitt 5.5.5) spricht dies für einen mitochondrialen Signalweg, der durch CD69-Engagement eingeschlagen wird.

Warum auch durch anti-CD95-mAk die intrazelluläre *bcl-2*-Protein-Expression abnimmt, ist auf Grund der vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt. Der CD95-Signalweg ist durch eine sequenzielle Aktivierung einer Anzahl von Caspasen charakterisiert ¹⁵¹. Das Todessignal wird auf der Rezeptorebene durch die Aktivierung der Caspase-8 im „death-inducing signaling complex“ (DISC) initiiert ¹⁰⁵. Es gibt nun zwei verschiedene CD95-vermittelte Apoptosesignalwege in verschiedenen Zelltypen: Typ II-Zellen sind von der apoptotischen Aktivität der Mitochondrien abhängig, während in Typ I-Zellen das Signal vornehmlich über Caspasen weitergeleitet wird ^{8,133}. Für Typ II-Zellen ist Caspase-9-Aktivierung typisch. Da in der vorliegenden Arbeit nur der Caspase-8-Inhibitor einen signifikanten Einfluss auf die CD95-vermittelte Viabilitätsreduktion zeigte, ist davon auszugehen, dass eosinophile Granulozyten zu den Typ I-Zellen gehören. Die Änderung der mitochondrienassoziierten *bcl-2*-Expression spricht nicht dagegen, da, wie in der prototypischen Typ I-Zelllinie SKW6.4 mit *bcl-2*-Überexpression gezeigt wurde ¹⁵⁶, mitochondrienabhängige Vorgänge, wie Phosphatidylserin-Externalisierung, von anderen Ereignissen des Apoptoseprogramms unabhängig sein können. Zur weiteren Klärung der Zugehörigkeit eosinophiler Granulozyten zu Typ I-Zellen sind aber noch weiterführende Experimente nötig, vor allem zur Aktivierung der verschiedenen Caspasen und von Protein-Kinase C (PKC) ¹³³.

Bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten war die CD69-vermittelte Viabilitätsreduktion im Gegensatz zu früheren Versuchsreihen (unveröffentlichte Beobachtung) sehr gering. Humane eosinophile Granulozyten aus dem peripheren Blut weisen zwischen den verschiedenen Spendern z.T. große Unterschiede in Hinsicht auf die Apoptose-Induktion auf ⁷⁴. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass CD69 die *bcl-2*-Expression reduziert. Für eine starke Viabilitätsreduktion spielt aber vielleicht der Priming-Status der eosinophilen Granulozyten eine kritische Rolle ⁸⁴. Dabei kann es je nach Priming-Zustand der Eosinophilen zu einer

differenten Expression der Mitglieder der *bcl-2*-Protein-Familie kommen. Es hängt vom Gleichgewicht der Expression anti- und pro-apoptotischer Mitglieder dieser Familie ab, ob eine Apoptose induziert wird oder nicht. Die Betrachtung der mRNA-Expression von *bcl-2*, *bcl-x_L* und *bax* nach CD69-Engagement (Abschnitt 4.7) gibt hier auch keinen Aufschluss, da nach 24 h Kultur sowohl die mRNA für das anti-apoptotische *bcl-2* und das pro-apoptotische *bax* erhöht wurde. Eine erhöhte Expression von *bax* wäre zu erwarten gewesen, eine Erhöhung von *bcl-2* jedoch nicht. Die Expression des anti-apoptotischen *bcl-x_L* blieb unverändert. Möglicherweise ist hierbei die zeitliche Regulation der apoptotischen Vorgänge besonders wichtig. Um die Bedeutung der *bcl-2*-Protein-Familie bei der eosinophilen Apoptose und im speziellen der CD69-induzierten Apoptose zu klären, sind weiterführende Experimente zur zeitlichen Expression der verschiedenen Mitglieder dieser Protein-Familie notwendig.

5.5.5 Rolle von Caspasen bei der Regulation des Überlebens und der Apoptose eosinophiler Granulozyten

Eine zentrale Rolle für den Prozess der Apoptose spielt die Familie der Initiator- und Effektor-Proteasen. Diese Cystein-Aspartat-Proteasen werden wegen des Cysteins im aktiven Zentrum und der Eigenschaft, andere Proteasen an der Aminosäure Aspartat zu spalten, als Caspasen bezeichnet. Caspasen aktivieren sich wechselseitig durch proteolytische Spaltung und entsprechen dem *ced-3* Genprodukt von *C. elegans*¹⁵¹. Caspasenspaltung gilt als Hinweis auf das Stattfinden einer Apoptose.

Sobald die Apoptose eingeleitet worden ist, wird aus den Mitochondrien Cytochrom c freigesetzt. Dieses assoziiert mit einem Protein mit der Bezeichnung Apaf-1. Der dabei entstehende Komplex aktiviert das Caspasensystem, das aus einer Kaskade verschiedener Proteine besteht, die für das Überleben der Zelle notwendige Proteine sowie Nukleinsäuren durch limitierte Proteolyse aktivieren oder deaktivieren. So aktiviert z.B. Apaf-1 Caspase-9, die ihrerseits über Caspase-3 und Caspase-7 die Spaltung von Endprodukten wie Poly-(ADP)-ribosylierendem Protein (PARP) und Lamin vermittelt. Darüber hinaus werden DNasen aktiviert, wie z.B. die

caspaseaktivierte DNase (CAD). Außerdem werden durch Caspasen die Funktionen des Zytoskeletts gestört und Adhäsionsmoleküle gehemmt, was zur Ablösung der Zelle aus dem Zellverband führt und die Phagozytose erleichtert. Die für die Apoptose nötigen Caspasen variieren je nach Zelltyp.

Pro-Caspasen und andere für die Apoptose notwendige Proteine werden auch von gesunden Zellen produziert und sind somit ständig vorrätig. Es bedarf daher nur eines Auslösers, um das Apoptoseprogramm in Gang zu setzen, damit dann in einem entsprechenden Mikromilieu ein unmittelbar in die Apoptose mündender Prozess zur Verfügung steht.

Wenn Mitochondrien verletzt werden, kann das austretende Cytochrom c die in der Zelle vorhandenen Pro-Caspasen aktivieren. Auch wenn die Zelle von außen zur Apoptose angeregt wurde, verstärkt das in das Zytoplasma freigesetzte Cytochrom c den Prozess. Ebenfalls kann geschädigte DNA des Zellkerns zur Apoptose führen.

Durch die Hemmung von Caspasen kann das Apoptoseprogramm unterbrochen werden. Beispielsweise können einige Viren durch die Hemmung von Caspasen den Tod der Wirtszelle verhindern und damit ihr eigenes Überleben sichern. CrmA (cytokine response modifier A) wird von Kuhpockenviren produziert und inhibiert Apoptose, indem es an die aktiven Domänen der Caspasen-1 und -3 bindet⁴⁷. Das vom Baculovirus gebildete Protein p35 hemmt irreversibel verschiedene Caspasen¹⁷⁰, besonders effizient jedoch Caspase-3.

Auch am Anfang des Signalweges des Todesrezeptors CD95 steht eine Caspase. Caspase-8 (FLICE) besitzt zwei Komponenten: (1) eine, die einem Adaptormolekül ähnelt, und (2) eine, die wie eine Caspase gespalten werden kann. Deswegen bildet sie eine direkte Verbindung zwischen Rezeptoren und Effektoren (wie z.B. den Effektor-Caspasen), die in einigen Zellen zu einer besonders raschen und effektiven Umsetzung der Apoptose führen.

Die Beteiligung von Caspase-8 am CD95-induzierten Signalweg bei eosinophilen Granulozyten⁹⁵ konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abschnitt 4.10). Dies spricht dafür, dass in diesen Zellen der für CD95 typische Signalweg etabliert ist

und bestätigt eine Studie, in der für CD95-induzierten Zelltod bei humanen Blut-Eosinophilen eine Aktivierung der Caspase-8 gezeigt werden konnte³⁰. Eosinophile Granulozyten können nicht nur CD95 sondern auch den Liganden CD95L exprimieren³⁰. Ein CD95-Rezeptorblocker hat keinen Einfluss auf die CD69-vermittelte Apoptose (Abschnitt 4.9), was es unwahrscheinlich macht, dass die CD69-induzierte Apoptose Eosinophiler auf eine autokrine oder parakrine Aktivierung des CD95/CD95L-Systems zurückzuführen ist. CD69 bedient sich daher wohl nicht der „Downstream“-Elemente des CD95-Signalwegs, sondern aktiviert vermutlich einen Signaltransduktionsweg unter Einbeziehung der Mitochondrien. Dafür spricht auch, dass an der CD69-Signaltransduktion die Caspase-9 beteiligt ist, die mit einem Signalweg über Mitochondrien und Apaf-1 assoziiert ist (Abbildung 5.4 und 5.5). Dies spricht für eine grundlegend unterschiedliche Signaltransmission der beiden untersuchten Apoptose-Mechanismen bei eosinophilen Granulozyten.

In einer Arbeit zu Rezeptor-vermittelter Apoptose und Caspasen-Aktivierung bei der humanen Eosinophilen-ähnlichen Zelllinie EoL-1 wurde bei anti-CD69-mAk-induzierter Apoptose mit Hilfe von Caspase-Inhibitoren im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen eine Beteiligung nicht nur der Caspase-9, sondern auch der Caspase-8 nachgewiesen⁴. Die entscheidende Ursache für diesen Unterschied dürfte in den unterschiedlichen Expressionsmustern von CD69 liegen. Die EoL-1-Zellen wurden mittels dbcAMP differenziert und zeigten große Ähnlichkeit zu peripheren Blut-Eosinophilen in Hinsicht auf Phänotyp, Morphologie und Proteininhalt der Granula. Im Gegensatz zu peripheren Blut-Eosinophilen exprimieren EoL-1 CD69 konstitutiv zu ca. 20 % bei undifferenzierten Zellen und nach dbcAMP-Behandlung nur noch zu ca. 10 %. Naive Blut-Eosinophile exprimieren kein CD69. CD69 wird jedoch nach Aktivierung der Eosinophilen z.B. durch GM-CSF induziert. Die unterschiedliche CD69-Expression bei der Zelllinie und bei Blut-Eosinophilen dürfte daher auch in einer unterschiedlichen Regulation der Signalweiterleitung nach CD69-Ligation zum Ausdruck kommen.

Bei den EoL-1-Zellen konnte eine Aktivierung nur für Caspase-3 und Caspase-8, nicht jedoch für Caspase-9 gezeigt werden, was im Widerspruch zu den Arbeiten mit den Enzym-Inhibitoren steht. Der Grund hierfür dürfte darin liegen, dass die verwendete Methode (CaspaTagTM) die Caspase-Aktivierung nur über einen kurzen

Zeitraum betrachtet, während Caspase-Inhibitoren über die gesamte Inkubationszeit anwesend bzw. wirksam sind. Für periphere Blut-Eosinophile stehen korrespondierende Experimente noch aus.

In Abbildung 5.5 ist eine Zusammenfassung der Mechanismen der CD69- bzw. CD95-induzierten Apoptose eosinophiler Granulozyten dargestellt.

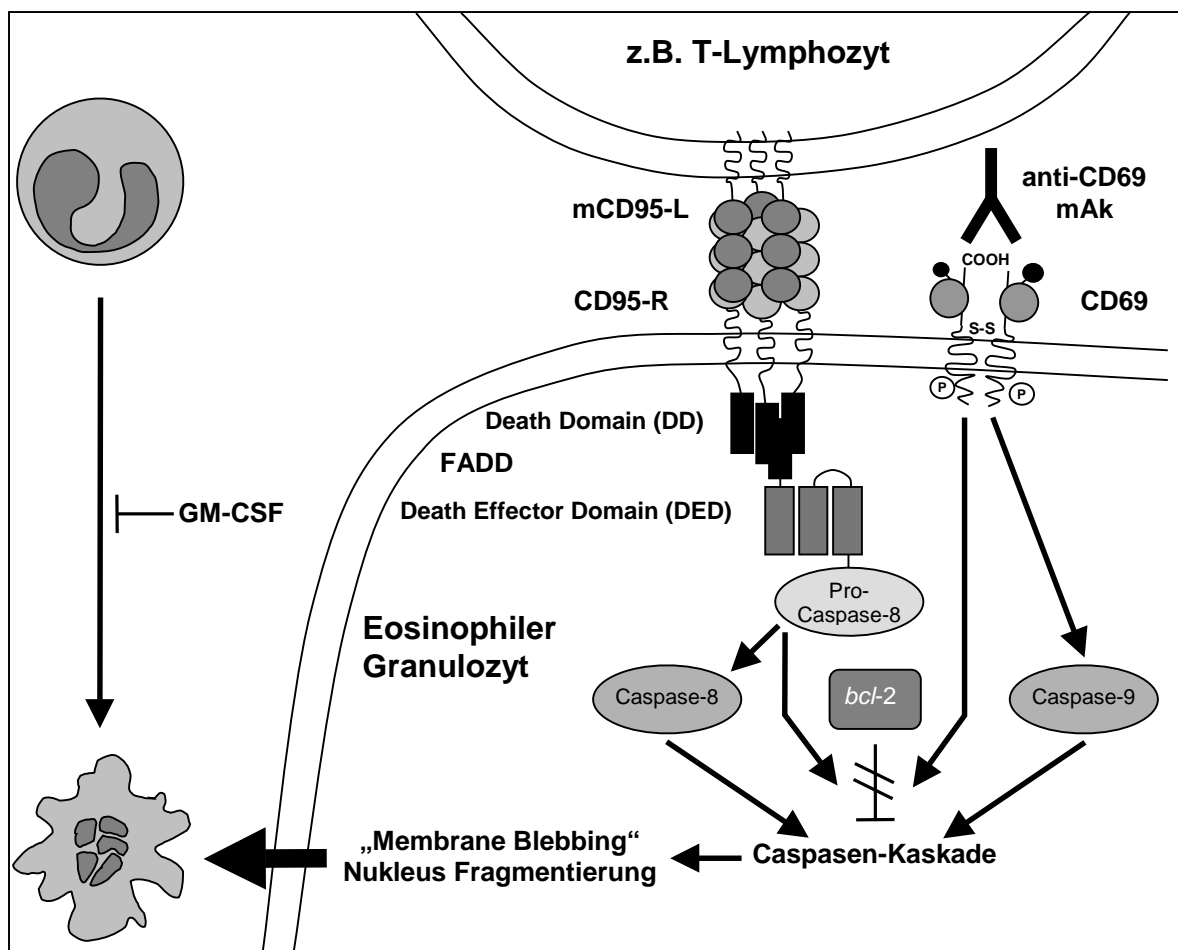


Abbildung 5.5: Mechanismen der CD69- bzw. CD95-induzierten Apoptose eosinophiler Granulozyten.

5.6 Modulation der Rezeptor-vermittelten Apoptose durch Proteasen

Während der akuten Asthma-Exazerbation kommt es zu einem vermehrten Anstieg der Glykosamin (GAGs)-Konzentration im Urin. GAGs entstehen beim Abbau von Glykosaminen auf der Zellmembran und innerhalb der Extrazellulären Matrix (ECM)

durch Matrix-Metalloproteasen und sind daher ein indirektes Maß für die Aktivität der Enzyme im Rahmen der asthmatischen Entzündung. Weiterführende Studien am Modell der segmentalen Allergenprovokation haben gezeigt, dass die MMP-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit während der allergischen Spätreaktion in den Atemwegen signifikant zunimmt, während sie unmittelbar nach Allergenexposition nahe der Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml liegt. In einem BMBF-geförderten vorausgegangenen Forschungsprojekt ließ sich unter Verwendung spezifischer Antikörper mittels Immunpräzipitation nachweisen, dass die MMP-Aktivität in der BAL überwiegend der MMP-9 zuzuordnen ist, die als 92 kDa großes Einzelprotein vorliegt, aber *in vivo* auch zu höhermolekularen Komplexen aggregieren kann. Ein kleinerer Teil der MMP-Aktivität geht vermutlich auf die 72 kDa große MMP-2 zurück. Der Anstieg der MMP-Konzentration korrelierte hochsignifikant mit der Zahl der in das Atemwegslumen eingewanderten eosinophilen und neutrophilen Granulozyten.

Metalloproteinasen besitzen über ihren Effekt auf den Umbau der extrazellulären Matrix hinaus noch andere Funktionen, zu denen auch der Einfluss auf den Phänotyp von Entzündungszellen gehört. So konnte gezeigt werden, dass MMP-9 die Expression von CD11b reduzierte. Der zugrunde liegende Mechanismus (proteolytische Abtrennung, Konformationsänderung oder anderes) und vor allem die biologische Bedeutung dieser Wirkung ist noch nicht bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass sich die Expression des CD11b-Antigens durch MMPs regulieren lässt (Abschnitt 4.3). Die Prozessierung von Oberflächenproteinen durch Metalloproteinasen bildet einen völlig neuen Mechanismus an der Schnittstelle zwischen chronischer Entzündung und Gewebeschädigung und könnte auch die Fähigkeit bestimmter Zellen zur Apoptose modulieren. Alternativ wäre eine proteolytische Abspaltung des Apoptose-induzierenden CD95-Liganden (CD95L) denkbar, z.B. durch die beim Asthma vermehrt sezernierten MMPs, wobei die lösliche Form des CD95L (sCD95L) die Apoptose-Induktion im Sinne einer negativen Feed-back-Schleife inhibieren könnte ^{134,145}.

5.7 Medizinische und therapeutische Bedeutung der Ergebnisse

5.7.1 Apoptose als therapeutische Möglichkeit

Verschiedene Medikamente, die z.T. bei heutigen Therapien empirisch eingesetzt werden, wirken über apoptotische Mechanismen. So vermindern Immunsuppressiva wie z.B. Cyclosporin A oder Kortikoide die Überlebenszeit von Immunzellen durch Apoptose^{65,104,132}. Darüber hinaus aber induziert die Klasse der Chemotherapeutika in definierten Konzentrationen in Tumorzellen eine Apoptose. Tierexperimentell ließ sich zeigen, dass Inhibitoren von Caspasen Infarktgebiete verringern und Organversagen verhindern. Zusammen mit den hier vorgestellten neuen Ergebnissen in der Apoptoseforschung ergeben sich weitere Anhaltspunkte für den Wirkungsmechanismus und damit die gezielte Entwicklung neuer Substanzen zur Behandlung humaner Krankheiten.

5.7.2 Allergeninduzierte Migration des eosinophilen Granulozyten in das Bronchiallumen

Der eosinophile Granulozyt stellt die dominierende Effektorzelle der asthmatischen Atemwegsentzündung dar, die durch Aktivierung und Sekretion ihrer Granulaproteine und durch Bildung von Sauerstoffradikalen wesentlich zur Pathogenese des Asthma bronchiale beiträgt (vergleiche Abschnitt 1.13). Neben der direkten, vom Eosinophilen vermittelten Schädigung des Epithelgewebes, die mit der Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität im Zusammenhang steht, scheint die Zelle durch Sekretion von TGF- β und MMP-9 auch am Remodelling der Atemwege beteiligt zu sein.

Zur Simulation der allergischen asthmatischen Reaktion am Menschen wurde die Methode der segmentalen Allergenprovokation etabliert, die von unserer Arbeitsgruppe seit etwa 10 Jahren erfolgreich durchgeführt wird^{42,73,86}. Nach endobronchialer Allergenprovokation nimmt die Eosinophilenzahl innerhalb von 18 h im exponierten Segment hochsignifikant zu^{87,162}. Parallel dazu kommt es zur Sekretion von Zytokinen des Th2-Typs (GM-CSF), während die Konzentrationen der Th1-Typ-Zytokine (z.B. IFN- γ) unverändert bleiben¹⁶². Auch die IL-13-Konzentration ist in der bronchoalveolären Lavage von Asthmatikern nach Allergenprovokation

erhöht. Die gesteigerte Eosinophileninfiltration korrelierte mit der IL-13-Konzentration in der BAL ⁸⁵.

5.7.3 Die Bedeutung eosinophiler Granulozyten für das Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegsentzündung, die durch eine prominente bronchiale Infiltration von eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet ist ^{15,86,137} (siehe Abschnitt 1.13).

Obwohl der genaue Mechanismus, der der Gewebeeinfiltration von Eosinophilen und deren Anreicherung unterliegt, noch nicht völlig geklärt ist, sind zwei prinzipielle Ursachen denkbar: (1) Chemokine, die zu einer selektiven Anreicherung von Eosinophilen im Gewebe führen, und (2) überlebensverlängernde Faktoren, die die zelluläre Überlebensfähigkeit modifizieren können ⁸⁴. Sowohl die funktionelle Langlebigkeit als auch die Entfernung überflüssiger Zellen aus dem Gewebe wird durch Apoptose kontrolliert. Weil mature, zirkulierende Eosinophile sowie Gewebe-Eosinophile enddifferenzierte Zellen sind, sind sie unfähig zur Proliferation und Selbsterneuerung. Die fehlerhafte Regulation der Überlebensfähigkeit der Eosinophilen dürfte den Hauptmechanismus, durch den funktionelle Eosinophile am Ort der Entzündung angereichert werden, darstellen. Daher ist die Apoptose eosinophiler Granulozyten wahrscheinlich der bestimmende Faktor für das Ausmaß ihrer Gewebeeinfiltration und wichtig für die Kontrolle der Entzündung. Tatsächlich könnte die asthmatische Entzündung als die Folge des massiv gestörten Gleichgewichts zwischen dem Eindringen potentiell schädlicher Eosinophiler in die Atemwege und ihrer physiologischen Beseitigung durch Apoptose gesehen werden.

Ein normaler eosinophiler Granulozyt hat eine Halbwertszeit in der Zirkulation von 6 bis 10 Stunden. Blut- und BAL-Eosinophile, die *in vitro* inkubiert werden, durchlaufen eine konstitutive Apoptose, wobei ungefähr die Hälfte der Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden absterben und die übrigen innerhalb von 4 Tagen ^{99,168}. Das Überleben von Eosinophilen in Kultur kann jedoch durch Inkubation mit GM-CSF bzw. IL-3 sowie mit anderen Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 deutlich und zwar bis zu 8 Tagen verlängert werden ⁹⁹.

In den letzten Jahren kam allerdings eine kontroverse Diskussion zur Rolle des eosinophilen Granulozyten beim Asthma bronchiale auf. Eine experimentelle Depletion Eosinophiler durch Gabe von anti-IL-5-mAk oder bei IL-5^{-/-}-Mäusen führte im Tiermodell zu gegensätzlichen Ergebnissen in Bezug auf die bronchiale Hyperreagibilität^{28,44,90}. In ersten Studien am Menschen zur Gabe von anti-IL-5-mAk zeigte sich ebenfalls wie im Tiermodell eine Reduktion der Eosinophilenzahl in Blut und Sputum, aber kein Einfluss auf bronchiale Hyperreagibilität, asthmatische Spätreaktion oder Lungenfunktion^{41,93}. Dies führte zur Diskussion, ob eosinophile Granulozyten tatsächlich eine Effektorfunktion beim Asthma ausüben oder nur „zufällige Zuschauer“ sind. Ein Nachteil der bisherigen Studien ist allerdings, dass die Eosinophilen zwar reduziert, aber nicht völlig eliminiert wurden, so dass die noch vorhandenen Zellen durchaus Effektorfunktionen erfüllen könnten. Durch zwei unterschiedliche transgene Strategien konnten nun Mäuse hergestellt werden, die Eosinophil-defizient sind^{64,94}. In einem Modell zeigten die Δ dblGATA-Mäuse zwar mit bronchialer Hyperreagibilität und übermäßiger Mucus-Produktion die „akuten“ pathophysiologischen Manifestationen des Asthmas, das Atemwegs-Remodelling war hingegen abgeschwächt⁶⁴, was in Übereinstimmung mit den Human-Studien mit IL-5-Antikörpern ist. Im anderen Modell waren die *PHIL*-Mäuse komplett vor bronchialer Hyperreagibilität und teilweise vor Mucus-Metaplasie geschützt⁹⁴.

Zusammengefasst sprechen die hier bereits genannten Ergebnisse doch für eine Effektorfunktion des eosinophilen Granulozyten beim Asthma bronchiale. Dabei dürfte diese Funktion zum einen durch eine Beteiligung des Eosinophilen am Atemwegs-Remodelling, nämlich durch die Zerstörung des Atemwegsepithels mittels Eosinophilen-Toxine und der Sekretion von TGF- β und Metalloproteinasen vermittelt werden. Ein weiterer Hinweis für diese Hypothese ist die Beobachtung, dass Kortikosteroide das Gleichgewicht der mRNA-Expression von MMP-9 und TIMP-1 bei aktivierten Eosinophilen zur Seite des anti-proteolytischen TIMP-1 verschieben (eigene, unveröffentlichte Beobachtung). Der zweite Mechanismus dürfte auf der Produktion von Th2-Zytokinen, wie IL-13, beruhen, die bei *PHIL*-Mäusen supprimiert waren. Daher bietet eine Therapie, die auf die Elimination bzw. Inhibition der Funktion eosinophiler Granulozyten abzielt, durchaus eine wirksame Alternative zur herkömmlichen Behandlung.

5.7.4 Therapeutische Perspektive

Bisherige immunhistologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass infiltrierende Atemwegs-Eosinophile sich in einem aktivierten Zustand befinden^{45,140}. Um den Aktivierungszustand der Eosinophilen zu bestimmen, wurde in der vorliegenden Studie die Oberflächenexpression des CD69-Antigens auf BAL-Zellen gewählt (Abschnitt 4.12). In Eosinophilen kann die CD69-Expression durch IL-3, IL-5 bzw. GM-CSF *in vitro* induziert werden^{42,58,99,114} (Abschnitt 4.1). Des Weiteren wurden CD69-exprimierende bronchoalveoläre Eosinophile bei Patienten mit eosinophiler Pneumonie gefunden¹¹⁴. Diese Ergebnisse haben zur Vermutung geführt, dass CD69 ein sensibler Indikator für die Aktivierung Eosinophiler als Antwort auf Zytokine ist, die während einer Entzündung freigesetzt werden⁷³. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Beobachtungen erweitert und es wurde gezeigt, dass BAL-Eosinophile, die 18 h nach Allergenprovokation gewonnen wurden, ebenso das CD69-Antigen exprimieren (Abschnitt 4.12). Während dieses Ergebnis die Vorstellung, dass CD69 den zellulären Aktivierungszustand reflektiert, unterstützt, ist die tatsächliche Rolle von CD69 für die eosinophile Zellfunktion noch nicht etabliert. Bei T-Lymphozyten wird CD69 sehr schnell als Antwort auf zelluläre Stimulation exprimiert und ist in Signaltransduktionsmechanismen, die mit der Aktivierung der Proteinkinase C assoziiert sind, involviert^{54,173}. Außerdem induziert die Ligation von CD69 mit einem anti-CD69-mAk die Proliferation von T- und B-Lymphozyten und die Zytokin-Genexpression in T-Lymphozyten. Überdies wurde die Bindung von anti-CD69-mAk mit granulärer Exozytose bei T-Lymphozyten assoziiert^{54,173}. Die funktionellen Studien mit CD69-Ligation bei T-Lymphozyten und die Beschränkung der CD69-Expression auf aktivierte Eosinophile spricht für eine generelle Rolle dieses Oberflächenmoleküls, das mit Signaltransduktionsprozessen in engem Zusammenhang stehen dürfte.

Ein hohes Niveau der CD69-Expression wird während einer ablaufenden asthmatischen Entzündung in der bronchoalveolären Flüssigkeit 18 h nach Allergen-Provokation erreicht, aber auch *in vitro* nach Inkubation naiver Blut-Eosinophiler mit Zytokinen, die mit der allergischen Entzündung assoziiert sind (Abschnitt 4.1 und 4.12). Daher werden Eosinophile grundsätzlich für CD69-induzierte Apoptose, im Gegensatz zu CD95-induzierter Apoptose, nur nach entsprechender Aktivierung in

einem allergischen Mikromilieu empfänglich. In Anbetracht dessen scheint CD69 einen idealen Oberflächen-Todesrezeptor für die Elimination Eosinophiler darzustellen, der selektiv nur an aktivierten Eosinophilen wirkt. Die Beschränkung des Apoptose-induzierenden Effekts auf aktivierte Eosinophile im Rahmen eines entzündlichen Vorgangs könnte einen physiologischen Regulationsmechanismus darstellen, der der Entzündung bzw. der Eosinophilen-Infiltration entgegenwirkt (Abbildung 5.6).

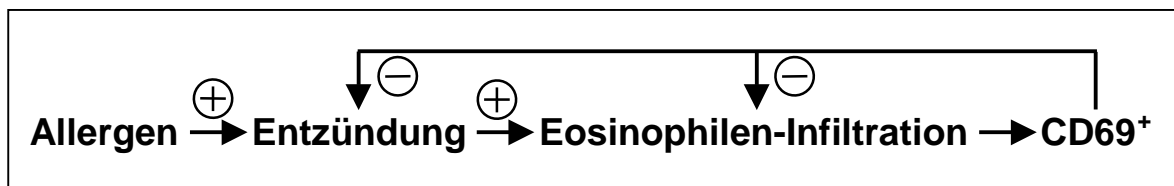


Abbildung 5.6: Schema der Bedeutung des Oberflächen-Antigens CD69 für die allergische Entzündung beim Asthma bronchiale.

Andererseits könnten nicht-apoptotische Nebeneffekte von anti-CD69-mAk bei anderen CD69-exprimierenden Zellen, v.a. bei T- und B-Lymphozyten, auftreten. Die möglichen Effekte wie Proliferation, Ca^{2+} -Mobilisierung und IL-2-, TNF- α - und IFN- γ -Produktion benötigen im Wesentlichen eine Kostimulation, z.B. durch PMA oder anti-CD3-mAk, und dürften daher bei der Asthmabehandlung irrelevant sein^{20,112,126,131,148}. Diese Befunde lassen es möglich erscheinen, dass z.B. mittels inhalativer Applikation von anti-CD69-mAk eine annähernd selektive Apoptose-Induktion eosinophiler Granulozyten möglich ist, ohne andere Zellen und Immunmechanismen zu beeinflussen.

5.8 CD69 als inhibitorischer Rezeptor

Wie viele der NK-Zell-Rezeptoren binden CD28- und CTLA-4-Rezeptoren auf T-Lymphozyten die gleichen Liganden (z.B. CD80 und CD86). Trotzdem erzeugen diese Rezeptoren sowohl aktivierende als auch inhibitorische Signale²¹. Der zytoplasmatischen Domäne von CTLA-4 fehlt eine ITIM-Sequenz. Obwohl CTLA-4 mit SHP-2 assoziiert ist¹⁰¹, bleibt bislang unbekannt, ob diese Phosphatase für die

suppressive Aktivität dieses Rezeptors verantwortlich ist. *In vitro*-Studien legen nahe, dass die Mutation der Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne von CTLA-4 oder die vollständige Beseitigung der zytoplasmatischen Domäne nicht ausreicht, um das inhibitorische Signal des Rezeptors zur Suppression der T-Zell-Aktivierung zu unterbinden^{9,23}. Daher bleibt der molekulare Mechanismus für diese CTLA-4-Aktivität bisher noch unbekannt. Trotzdem wird die inhibitorische Funktion von CTLA-4 in Mäusen verdeutlicht, bei denen das Gen homozygot zerstört worden ist. Diese Tiere sterben an einer T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung innerhalb eines Monats nach der Geburt, was die kritische Funktion dieses Moleküls bei der Kontrolle der T-Zell-Aktivierung eindrucksvoll verdeutlicht¹⁵².

Für die Funktion des Immunsystems ist die Inhibition ebenso wichtig wie die Aktivierung, wie tödlich verlaufende Autoimmunerkrankungen belegen, bei denen die inhibitorischen Rezeptoren eliminiert wurden. Die Signifikanz dieser Rezeptoren wird auch dadurch belegt, dass das ITIM-Motiv in Immunrezeptoren im Laufe der Evolution hochgradig konserviert wurde.

Für CD69 lässt sich durch seine Verwandtschaft zu Ly49 und CD94/NKG2 auch eine Rolle als inhibitorischer Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten postulieren. Wie Ly49D und Ly49H⁹¹ fehlt CD69 jedoch die ITIM-Domäne. Alle drei haben eine Funktion als Aktivatoren, CD69 dient z.B. als Kostimulus auf Lymphozyten und führt zur Zytokinproduktion und bei NK-Zellen zur Proliferation (siehe Abschnitt 5.1.5). Andererseits könnte CD69 wie auch CD94, das ebenfalls nur eine kurze intrazelluläre Domäne besitzt und mit dem ITIM-tragenden NKG2A assoziiert ist^{18,92}, auf bestimmten Zelltypen noch unbekannterweise mit ITIM-tragenden Rezeptoren assoziiert sein und dadurch eine inhibitorische Funktion ausüben. Auf eosinophilen Granulozyten kann CD69 auf Grund seiner Fähigkeit zur Apoptoseinduktion (Abschnitt 4.4) als inhibitorischer Rezeptor verstanden werden. CD69 dient also als Antagonist zu den zellviabilitätsverlängernden Rezeptoren für IL-3, IL-5 und GM-CSF (Abbildung 5.7). Dieser Mechanismus ist dem CD95-induzierten AICD auf Lymphozyten ähnlich, indem parallel zur Aktivierung der Zellen die Expression eines Apoptose-induzierenden Faktors erfolgt. So wird zu Beginn der Entzündungsantwort auch die Voraussetzung zu deren Begrenzung geschaffen.

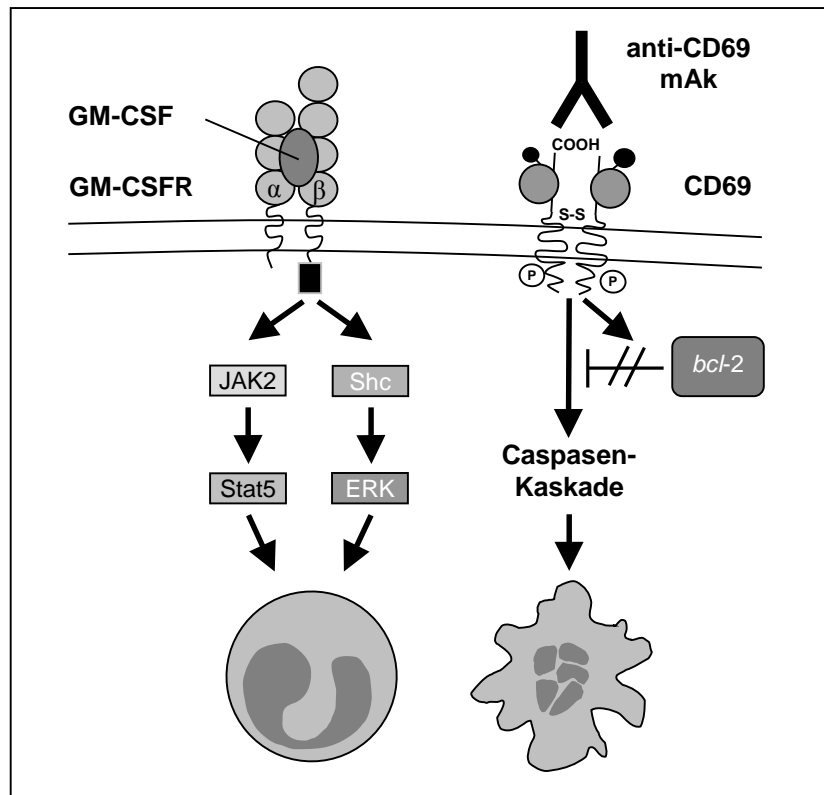


Abbildung 5.7: Schema der antagonistischen Rezeptoren GM-CSF und CD69 auf eosinophilen Granulozyten.

5.9 Experimentelle Kritik und Ausblick

Ein allgemeines Problem bei der Erforschung der Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten aus dem peripheren Blut besteht darin, dass diese Zellen zwischen den verschiedenen Spendern z.T. große Unterschiede in Hinsicht auf die Apoptose-Induktion aufweisen können⁷⁴, was auch mit eigenen Erfahrungen (unveröffentlicht) übereinstimmt. Darüber hinaus besteht eine vermutlich GM-CSF-bedingte Resistenz gegenüber Apoptose-Induktion bei eosinophilen Granulozyten asthmatischer und allergischer Individuen^{75,167}.

Einen weiteren Faktor bildet die geringe Anzahl eosinophiler Granulozyten, die aus dem Blut gewonnen werden kann. Auch beeinflussen die individuellen Unterschiede der Eosinophilen verschiedener Spender bei einer aus statistischer Sicht „niedrigen“ n-Zahl die Signifikanzbestimmung und erschweren die Interpretation der Ergebnisse.

Trotzdem ist es erforderlich, die Zellbiologie und –funktion am humanen eosinophilen

Granulozyten zu untersuchen, da Experimente an Zelllinien wie EoL-1 wichtige Ergebnisse liefern können, die aber im Detail von den menschlichen Zellen abweichen ⁴.

Diese Arbeit zeigt neue Ergebnisse, die ein besseres Verständnis der Rezeptor-vermittelten Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten und wertvolle neue Einsichten in die zugrunde liegenden Mechanismen ermöglichen. Zu einer Vervollständigung dieses Bildes wären weiterführende Experimente von Nutzen. Zum einen sind Experimente zur Aktivierung von Caspasen von Interesse. Wichtig ist auch die differenzielle Regulation der Proteine der *bcl-2*-Familie. Die Wechselwirkung pro- und anti-apoptotischer Mitglieder bestimmt letztendlich, ob eine Apoptose ausgelöst wird oder nicht. Ein detaillierteres Verständnis der Expression der Proteine der *bcl-2*-Familie dürfte sowohl für die individuellen Schwankungen bei der CD69-vermittelten Apoptose Erkenntnisse bringen als auch für die allgemeine Apoptoseregulation humaner eosinophiler Granulozyten.

Zusammengefasst weisen die hier präsentierten Daten auf einen Mechanismus hin, durch den aktivierte Eosinophile selektiv zur Apoptose gebracht werden. Es ist vorstellbar, dass Inhalation von anti-CD69-mAk bei asthmatischen Patienten selektiv die Apoptose aktivierter Eosinophiler induziert und dadurch die Gesamtgewebebelastung dieser proinflammatorischen Zellen reduziert. Die hier präsentierten Ergebnisse bilden die Grundlage für einen neuen therapeutischen Ansatz bei der zukünftigen Behandlung des Asthma bronchiale.

6 LITERATUR

1. Anonymous. International Consensus Report on Diagnosis and Treatment of Asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute, Publication No. 92-3091. Eur Respir J 1992; 5:601-641.
2. Adams JM, Cory S. The *bcl-2* protein family: Arbiters of cell survival. Science 1998; 281:1322-1326.
3. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *seas*. Trends Biochem Sci 2001; 26:390-397.
4. Al-Rabia MW, Blaylock MG, Sexton DW, Walsh GM. Membrane receptor-mediated apoptosis and caspase activation in the differentiated EoL-1 eosinophilic cell line. J Leukoc Biol 2004; 75:1045-1055.
5. Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. J Exp Med 1995; 181:1235-1238.
6. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. Science 1998; 281:1305-1308.
7. Backman KS, Greenberger PA, Patterson R. Airways obstruction in patients with long-term asthma consistent with 'irreversible asthma'. Chest 1997; 112:1234-1240.
8. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. Semin Immunol 2003; 15:185-193.
9. Baroja ML, Luxenberg D, Chau T, Ling V, Strathdee CA, Carreno BM, Madrenas J. The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation. J Immunol 2000; 164:49-55.
10. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/Apo-1- and TNF-receptor-induced cell death. Cell 1996; 85:803-815.
11. Bolland S, Ravetch JV. Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. Adv Immunol 1999; 72:149-177.
12. Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in Fc(g)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. Immunity 2000; 13:277-285.
13. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immunol 2003; 39:615-647.
14. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. Immunology 1999; 97:159-165.
15. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony Lafontaine J, Godard P, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med 1990; 323:1033-1039.
16. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature 1995; 373:441-444.
17. Calhoun WJ. Summary of clinical trials with zafirlukast. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157:S238-S245.
18. Carretero M, Palmieri G, Llano M, Tullio V, Santoni A, Geraghty DE, Lopez-Botet M. Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. Eur J Immunol 1998; 28:1280-1291.

19. Cebrian M, Miguel Redondo J, Lopez Rivas A, Rodriguez Tarduchy G, De Landazuri MO, Sanchez Madrid F. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur J Immunol* 1989; 19:809-815.
20. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez Botet M, De Landazuri MO, Sanchez Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 168:1621-1637.
21. Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:203-210.
22. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81:505-512.
23. Cinek T, Sadra A, Imboden JB. Cutting edge: tyrosine-independent transmission of inhibitory signals by CTLA-4. *J Immunol* 2000; 164:5-8.
24. Cleveland JL, Ihle JN. Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell* 1995; 81:479-482.
25. Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T, Ravetch JV. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med* 1999; 189:179-185.
26. Cookson W, Moffatt M. Making sense of asthma genes. *N Engl J Med* 2004; 351:1794-1796.
27. Corrigan CJ. Elevated interleukin-4 secretion by T lymphocytes: a feature of atopy or of asthma? *Clin Exp Allergy* 1995; 25:485-487.
28. Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, Locksley RM. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996; 183:109-117.
29. D'Ambrosio D, Trotta R, Vacca A, Frati L, Santoni A, Gulino A, Testi R. Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69-generated signals. *Eur J Immunol* 1993; 23:2993-2997.
30. Daigle I, Simon HU. Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126:147-156.
31. Daniel PT, Krammer PH. Activation induces sensitivity toward Apo-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. *J Immunol* 1994; 152:5624-5632.
32. De Maria R, Cifone MG, Trotta R, Rippo MR, Festuccia C, Santoni A, Testi R. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med* 1994; 180:1999-2004.
33. Dewson G, Walsh GM, Wardlaw AJ. Expression of *bcl-2* and its homologues in human eosinophils - modulation by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:720-728.
34. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by Apo-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373:438-441.
35. Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M, Blaser K, ZangemeisterWittke U, Akbar AN, Simon HU. Role for *bcl-x(L)* in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood* 1998; 92:778-783.
36. Druilhe A, Arock M, Le Goff L, Pretolani M. Human eosinophils express *bcl-2* family proteins: modulation of Mcl-1 expression by IFN-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:315-322.
37. Druilhe A, Wallaert B, Tsicopoulos A, Lapa, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Pretolani M. Apoptosis, proliferation, and expression of *bcl-2*, Fas, and Fas ligand in bronchial biopsies from asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:747-757.

38. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383-424.
39. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000; 405:85-90.
40. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992; 149:4029-4035.
41. Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, Barnes N, Robinson D, Kay AB. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 2003; 112:1029-1036.
42. Foerster M, Haefner D, Kroegel C. *Bcl-2*-Mediated Regulation of CD69-Induced Apoptosis of Human Eosinophils: Identification and Characterization of a Novel Receptor-Induced Mechanism and Relationship to CD95-Transduced Signalling. *Scand J Immunol* 2002; 56:417-428.
43. Foerster M, Knoechel B, Julius P, Luttmann W, Kroegel C. Transkription, Expression und Engagement des CD69-Antigens. Identifikation eines neuen Apoptose-transduzierenden Oberflächenantigens. *Med Klinik* 1997; 107
44. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996; 183:195-201.
45. Frigas E, Gleich GJ. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:527-537.
46. Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 82:435-441.
47. Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RK, Drexler HC, Rotello RJ, Fishman MC, Yuan J. Prevention of vertebrate neuronal death by the *crmA* gene. *Science* 1994; 263:826-828.
48. Gavioli R, Risso A, Smilovich D, Baldissarro I, Capra MC, Bargellesi A, Cosulich ME. CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell Immunol* 1992; 142:186-196.
49. Gerosa F, Tommasi M, Benati C, Gandini G, Libonati M, Tridente G, Carra G, Trinchieri G. Differential effects of tyrosine kinase inhibition in CD69 antigen expression and lytic activity induced by rIL-2, rIL-12, and rIFN- α in human NK cells. *Cell Immunol* 1993; 150:382-390.
50. Gerosa F, Tommasi M, Scardoni M, Accolla RS, Pozzan T, Libonati M, Tridente G, Carra G. Structural analysis of the CD69 early activation antigen by two monoclonal antibodies directed to different epitopes. *Mol Immunol* 1991; 28:159-168.
51. Giles KM, Hart SP, Haslett C, Rossi AG, Dransfield I. An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges. *Br J Haematol* 2000; 109:1-12.
52. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:422-436.
53. Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kaneko Y, Hara N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:272-278.
54. Hamann J, Fiebig H, Strauss M. Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol* 1993; 150:4920-4927.

55. Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, Shinohara N, Matsuzawa A, Nishimura Y, Kobayashi Y, Yonehara S, Yagita H, Okumura K. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:4930-4934.
56. Hansel TT, De Vries IJ, Iff T, Rihs S, Wandzilak M, Betz S, Blaser K, Walker C. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods* 1991; 145:105-110.
57. Hara T, Jung LK, Bjorndahl JM, Fu SM. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med* 1986; 164:1988-2005.
58. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993; 80:281-286.
59. Healy JI, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:645-670.
60. Hebestreit H, Yousefi S, Balatti I, Weber M, Cramer R, Simon D, Hartung K, Schapowal A, Blaser K, Simon HU. Expression and function of the Fas receptor on human blood and tissue eosinophils. *Eur J Immunol* 1996; 26:1775-1780.
61. Her E, Frazer J, Austen KF, Owen WFJ. Eosinophil hematopoietins antagonize the programmed cell death of eosinophils. Cytokine and glucocorticoid effects on eosinophils maintained by endothelial cell-conditioned medium. *J Clin Invest* 1991; 88:1982-1987.
62. Horie S, Kita H. CD11b/CD18 (Mac-1) is required for degranulation of human eosinophils induced by human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and platelet-activating factor. *J Immunol* 1994; 152:5457-5467.
63. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84:299-308.
64. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 2004; 305:1776-1779.
65. Huss R, Hoy CA, Ottinger H, Grosse-Wilde H, Deeg HJ. Cyclosporine-induced apoptosis in CD4⁺-T lymphocytes and computer-simulated analysis: modeling a treatment scenario for HIV infection. *Res Immunol* 1995; 146:101-108.
66. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66:233-243.
67. Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, Seki H, Taniguchi N. Differential expression of *bcl-2* and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 1994; 84:1201-1208.
68. Jang AS, Choi IS, Lee S, Seo JP, Yang SW, Park CS. *Bcl-2* expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma. *Thorax* 2000; 55:370-374.
69. Jayaraman S, Castro M, O' Sullivan M, Bragdon MJ, Holtzman MJ. Resistance to Fas-mediated T cell apoptosis in asthma. *J Immunol* 1999; 162:1717-1722.
70. Jewett A, Bonavida B. Pentoxifylline suppresses interleukin-2-mediated activation of immature human natural killer cells by inhibiting endogenous tumor necrosis factor- α secretion. *J Clin Immunol* 1994; 14:31-38.
71. Jones RG, Elford AR, Parsons MJ, Wu L, Krawczyk CM, Yeh WC, Hakem R, Rottapel R, Woodgett JR, Ohashi PS. CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp Med* 2002; 196:335-348.

72. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373:444-448.
73. Julius P, Luttmann W, Knoechel B, Kroegel C, Matthys H, Virchow JC. CD69 surface expression on human lung eosinophils after segmental allergen provocation. *Eur Respir J* 1999; 13:1253-1259.
74. Kankaanranta H, De Souza PM, Barnes PJ, Salmon M, Giembycz MA, Lindsay MA. SB 203580, an inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, enhances constitutive apoptosis of cytokine-deprived human eosinophils. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:621-628.
75. Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:77-83.
76. Karlhofer FM, Yokoyama WM. Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J Immunol* 1991; 146:3662-3673.
77. Kay AB, Menzies-Gow A. Eosinophils and interleukin-5: the debate continues. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1586-1587.
78. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995; 182:1777-1783.
79. Kelekar A, Thompson CB. *Bcl-2*-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998; 8:324-330.
80. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
81. Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock A, Kerstjens HA, Postma DS, Danzig M, Cuss F, Pauwels RA. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1655-1659.
82. Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the Apo-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993; 5:625-630.
83. Krammer P. Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord. *Pharmazie in unserer Zeit* 1996; 25:306-310.
84. Kroegel C, Foerster M, Haefner D, Grahmann P, Warner J, Braun R. Putting priming in perspective – from cellular heterogeneity to cellular plasticity. *Immunol Today* 2000; 21:218-222.
85. Kroegel C, Julius P, Matthys H, Virchow JC, Jr., Luttmann W. Endobronchial secretion of interleukin-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to interleukin-4 and eosinophil counts. *Eur Respir J* 1996; 9:899-904.
86. Kroegel C, Liu MC, Hubbard WC, Lichtenstein LM, Bochner BS. Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects after segmental antigen challenge: surface phenotype, density heterogeneity, and prostanoïd production. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:725-734.
87. Kroegel C, Luttmann W, Matthys H, Virchow JC, Jr. Principles and applications of modern anti-inflammatory therapy of bronchial asthma. *Internist Berl* 1995; 36:546-559.
88. Kroegel C, Virchow JC, Jr., Luttmann W, Walker C, Warner JA. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur Respir J* 1994; 7:519-543.
89. Krug N, Thureau AM, Lackie P, Baier J, Schultze Werninghaus G, Rieger CH, Schauer U. A flow cytometric method for the detection of intracellular basic proteins in unseparated peripheral blood and bone marrow eosinophils. *J Immunol Methods* 1996; 190:245-254.

90. Kung TT, Stelts DM, Zurcher JA, Adams GK, Egan RW, Kreutner W, Watnick AS, Jones H, Chapman RW. Involvement of IL-5 in a murine model of allergic pulmonary inflammation: prophylactic and therapeutic effect of an anti-IL-5 antibody. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13:360-365.
91. Lanier LL, Bakker AB. The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. *Immunol Today* 2000; 21:611-614.
92. Le Drian E, Vely F, Olcese L, Cambiaggi A, Guia S, Krystal G, Gervois N, Moretta A, Jotereau F, Vivier E. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 1998; 28:264-276.
93. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356:2144-2148.
94. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG, Lee NA. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 2004; 305:1773-1776.
95. Letuve S, Druilhe A, Grandsaigne M, Aubier M, Pretolani M. Involvement of caspases and of mitochondria in Fas ligation-induced eosinophil apoptosis: modulation by interleukin-5 and interferon-gamma. *J Leukoc Biol* 2001; 70:767-775.
96. Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P, Flavell RA. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 2003; 302:1560-1563.
97. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:875-904.
98. Lopez Cabrera M, Santis AG, Fernandez Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez Mateos P, Sanchez Madrid F. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 1993; 178:537-547.
99. Luttmann W, Knoechel B, Foerster M, Matthys H, Virchow JC, Jr., Kroegel C. Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. *J Immunol* 1996; 157:1678-1683.
100. Luttmann W, Opfer A, Dauer E, Foerster M, Matthys H, Eibel H, SchulzeOsthoff K, Kroegel C, Virchow JC. Differential regulation of CD95 (Fas/Apo-1) expression in human blood eosinophils. *Eur J Immunol* 1998; 28:2057-2065.
101. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, Mak TW. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 1996; 272:1170-1173.
102. Matsumoto K, Schleimer RP, Saito H, Iikura Y, Bochner BS. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood* 1995; 86:1437-1443.
103. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 1999; 96:625-634.
104. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 1996; 156:4422-4428.
105. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16:2794-2804.
106. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992; 149:3753-3758.

107. Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N, Augugliaro R, Bottino C, Ciccone E, Moretta L. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 1991; 174:1393-1398.
108. Morii T, Nishikawa K, Ako H, Narita N. Expression of activation antigen CD69 on eosinophils. *Nippon Rinsho* 1993; 51:588-592.
109. Muhl H, Nold M, Chang JH, Frank S, Eberhardt W, Pfeilschifter J. Expression and release of chemokines associated with apoptotic cell death in human promonocytic U937 cells and peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:3225-3235.
110. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/ced-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85:817-827.
111. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-1456.
112. Nakamura S, Sung SS, Bjorndahl JM, Fu SM. Human T cell activation. IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA 1. *J Exp Med* 1989; 169:677-689.
113. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, Ryder LP, Koch C, Garred P. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33:2853-2863.
114. Nishikawa K, Morii T, Ako H, Hamada K, Saito S, Narita N. *In vivo* expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:169-174.
115. O'Connor R. Survival factors and apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 1998; 62:137-166.
116. O'Keefe TL, Williams GT, Batista FD, Neuberger MS. Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J Exp Med* 1999; 189:1307-1313.
117. Ochiai K, Kagami M, Matsumura R, Tomioka H. IL-5 but not interferon-g (IFN-g) inhibits eosinophil apoptosis by up-regulation of *bcl-2* expression. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:198-204.
118. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC. Purification and molecular cloning of the Apo-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; 267:10709-10715.
119. Owen Schaub LB, Yonehara S, Crump WL3, Grimm EA. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol* 1992; 140:197-205.
120. Owen WF, Jr., Rothenberg ME, Silberstein DS, Gasson JC, Stevens RL, Austen KF, Soberman RJ. Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J Exp Med* 1987; 166:129-141.
121. Park CS, Choi YS, Ki SY, Moon SH, Jeong SW, Uh ST, Kim YH. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airways. *Eur Respir J* 1998; 12:872-878.
122. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:12736-12737.
123. Pisegna S, Zingoni A, Pirozzi G, Cinque B, Cifone MG, Morrone S, Piccoli M, Frati L, Palmieri G, Santoni A. Src-dependent Syk activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells. *J Immunol* 2002; 169:68-74.

124. Priault M, Chaudhuri B, Clow A, Camougrand N, Manon S. Investigation of *bax*-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur J Biochem* 1999; 260:684-691.
125. Ramirez R, Carracedo J, Zamzami N, Castedo M, Kroemer G. Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes. *J Exp Med* 1994; 180:1147-1152.
126. Risso A, Cosulich ME, Rubartelli A, Mazza MR, Bargellesi A. MLR3 molecule is an activation antigen shared by human B, T lymphocytes and T cell precursors. *Eur J Immunol* 1989; 19:323-328.
127. Roos A, Xu W, Castellano G, Nauta AJ, Garred P, Daha MR, van Kooten C. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34:921-929.
128. Saita N, Yamanaka T, Kohrogi H, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Hirashima M. Expression of apoptosis-related antigen on eosinophils in chronic eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114 Suppl 1:64-66.
129. Sanchez Mateos P, Cebrian M, Acevedo A, Lopez Botet M, De Landazuri MO, Sanchez Madrid F. Expression of a gp33/27,000 MW activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. *Immunology* 1989; 68:72-79.
130. Sanchez Mateos P, Sanchez Madrid F. Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur J Immunol* 1991; 21:2317-2325.
131. Santis AG, Campanero MR, Alonso JL, Tugores A, Alonso MA, Yague E, Pivel JP, Sanchez Madrid F. Tumor necrosis factor- α production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol* 1992; 22:1253-1259.
132. Saunders MW, Wheatley AH, George SJ, Lai T, Birchall MA. Do corticosteroids induce apoptosis in nasal polyp inflammatory cells? *In vivo* and *in vitro* studies. *Laryngoscope* 1999; 109:785-790.
133. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 1999; 274:22532-22538.
134. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998; 187:1205-1213.
135. Shenker BJ, Berthold P, Rooney C, Vitale L, DeBolt K, Shapiro IM. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1993; 15:87-112.
136. Simon HU. Targeting apoptosis in the control of inflammation. *Eur Respir J* 2003; 44:20s-21s.
137. Simon HU, Blaser K. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? *Immunol Today* 1995; 16:53-55.
138. Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997; 158:3902-3908.
139. Spinozzi F, Fizzotti M, Agea E, Piattoni S, Droetto S, Russano A, Forenza N, Bassotti G, Grignani F, Bertotto A. Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary T cells from patients with asthma. *Ann Intern Med* 1998; 128:363.
140. Spry CFJ. Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature. Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press, 1988.

141. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, Gierschik P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD, Wetzker R. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 1995; 269:690-693.
142. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 1995; 154:3806-3813.
143. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75:1169-1178.
144. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994; 6:1567-1574.
145. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998; 4:31-36.
146. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14:1129-1135.
147. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15:479-483.
148. Testi R, Phillips JH, Lanier LL. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular $[Ca^{2+}]$ and stimulation of protein kinase C. *J Immunol* 1989; 142:1854-1860.
149. Testi R, Pulcinelli F, Frati L, Gazzaniga PP, Santoni A. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J Exp Med* 1990; 172:701-707.
150. Testi R, Pulcinelli FM, Cifone MG, Botti D, Del Grosso E, Riondino S, Frati L, Gazzaniga PP, Santoni A. Preferential involvement of a phospholipase A2-dependent pathway in CD69-mediated platelet activation. *J Immunol* 1992; 148:2867-2871.
151. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281:1312-1316.
152. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; 3:541-547.
153. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245:301-305.
154. Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, Trifilieff A, Tsuyuki J, Wesp M, Anderson GP, Coyle AJ. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J Clin Invest* 1995; 96:2924-2931.
155. Tugores A, Alonso MA, Sanchez Madrid F, De Landazuri MO. Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1. *J Immunol* 1992; 148:2300-2306.
156. Uthaisang W, Nutt LK, Orrenius S, Fadeel B. Phosphatidylserine exposure in Fas type I cells is mitochondria-dependent. *FEBS Lett* 2003; 545:110-114.
157. Vandenberghe P, Verwilghen J, Van Vaecck F, Ceuppens JL. Ligation of the CD5 or CD28 molecules on resting human T cells induces expression of the early activation antigen CD69 by a calcium- and tyrosine kinase-dependent mechanism. *Immunology* 1993; 78:210-217.
158. Vanham G, Kestens L, Vingerhoets J, Penne G, Colebunders R, Vandebrouaene M, Goeman J, Ceuppens JL, Sugamura K, Gigase P. The interleukin-2 receptor subunit expression and function on peripheral blood lymphocytes from HIV-infected and control persons. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71:60-68.

159. Vaux DL, Cory S, Adams JM. *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335:440-442.
160. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, Gagliardo R, Profita M, Bousquet J, Bonsignore G. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T-lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:563-573.
161. Virchow JC, Jr., Julius P, Matthys H, Kroegel C, Luttmann W. CD14 expression and soluble CD14 after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Eur Respir J* 1998; 11:317-323.
162. Virchow JC, Jr., Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, Kroegel C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:960-968.
163. Walker C, Rihs S, Braun RK, Betz S, Bruijnzeel PL. Increased expression of CD11b and functional changes in eosinophils after migration across endothelial cell monolayers. *J Immunol* 1993; 150:4061-4071.
164. Walsh GM, Williamson ML, Symon FA, Willars GB, Wardlaw AJ. Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1996; 87:2815-2821.
165. Warner JA, Julius P, Luttmann W, Kroegel C. Matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid following antigen challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:318-320.
166. Watanabe Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148:1274-1279.
167. Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: A common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:536-543.
168. Weisbart RH, Golde DW. Physiology of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors in host defense. *Hematol Oncol Clin North Am* 1989; 3:401-409.
169. Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1436:127-150.
170. Xue D, Horvitz HR. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease ced-3 by a ced-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 1995; 377:248-251.
171. Yasui K, Hu B, Nakazawa T, Agematsu K, Komiyama A. Theophylline accelerates human granulocyte apoptosis not via phosphodiesterase inhibition. *J Clin Invest* 1997; 100:1677-1684.
172. Zangrilli J, Robertson N, Shetty A, Wu J, Hastie A, Fish JE, Litwack G, Peters SP. Effect of IL-5, glucocorticoid, and Fas ligation on *bcl-2* homologue expression and caspase activation in circulating human eosinophils. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:12-21.
173. Ziegler SF, Levin SD, Johnson L, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Baker E, Sutherland GR, Feldhaus AL, Ramsdell F. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J Immunol* 1994; 152:1228-1236.
174. Zingoni A, Palmieri A, Morrone S, Carretero M, Lopez BM, Piccoli M, Frati L, Santoni A. CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94/NKG2-A inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 2000; 30:644-651.

7 APPENDIX

7.1 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Claus Kroegel bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat die vorliegende Arbeit in der Arbeitsgruppe Pneumologie & Allergologie, KIM I, anzufertigen und dessen Tür immer für mich offen stand.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Reinhard Wetzker dafür, die Arbeit vor der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät zu vertreten.

Besonderer Dank gilt Daniela Häfner, die die klinische Seite der segmentalen Allergenprovokation organisiert hat.

Ich danke meiner Schwester Christine R. Förster für das kritische Durchlesen des Manuskripts und meinen Eltern für die moralische Unterstützung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Pneumologie & Allergologie für die Bereitstellung des hervorragenden Arbeitsklimas bedanken.

7.2 Lebenslauf

Name: Förster

Vorname: Martin

Geburtsdatum: 10.08.1967

Geburtsort: Freiburg i. Br.

Familienstand: ledig

1977 - 1986 Berthold-Gymnasium Freiburg i. Br.

1986 - 1987 Wehrdienst

1987 - 1993 Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

1993 - 1994 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Zoologie der Universität Freiburg i. Br., Abschluss des Studiums mit dem akademischen Grad „Diplom-Biologe“

1994 - 1995 biochemisch / zellbiologische Arbeit in der Abteilung Pneumologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br. im Labor von OA Dr. Dr. C. Kroegel und Dr. W. Luttmann

1995 - 1996 wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Pneumologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br.

1996 wissenschaftliche Hilfskraft im Funktionsbereich Pneumologie & Allergologie, Abteilung I, der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

seit 1997 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Funktionsbereich Pneumologie & Allergologie, Abteilung I, der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

Jena, den 06.12.2004

Martin Förster

7.3 Aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen

Originalpublikationen

- Foerster M, Haefner D, Kroegel C. *Bcl-2*-mediated regulation of CD69-induced apoptosis of human eosinophils. Identification and characterization of a novel receptor-induced mechanism and relationship to CD95-transduced signaling. *Scand J Immunol* 2002, 56: 417-428.
- Foerster M, Braun RK, Kroegel C. Molekularer Mechanismus der Signaltransduktion im Rahmen der CD95- und CD69-Rezeptor-induzierten Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten. Einfluß auf die GM-CSF-vermittelte Viabilität und Beziehung zur intrazellulären *bcl-2*-Expression. *Pneumologie* 2000, 54: 464-467.

Abstrakts

- Foerster M, Haefner D, Braun RK, Kroegel C. Molecular mechanisms of CD69-induced apoptosis of eosinophil granulocytes. Evidence for the involvement of caspase-8 and caspase-9. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163: A323
- Foerster M, Haefner D, Braun RK, Kroegel C. Molekulare Mechanismen der CD69-induzierten Apoptose eosinophiler Granulozyten. Hinweise für die Beteiligung von Caspase 8 und Caspase 9. *Pneumologie* 2001, 55: S94
- Foerster M, Zaune A, Haefner D, Gardina P, Grahmann PR, Braun RK, Kroegel C. Molecular mechanism of ligand-associated apoptosis of human eosinophils. Regulation of *bcl-2* expression following occupation of CD69- and CD95-antigens. *Eur Resp J* 2000, 16 (Suppl.31): 556s.
- Foerster M, Zaune A, Haefner D, Gardina P, Grahmann PR, Braun RK, Kroegel C. *Bcl-2* expression in receptor-induced apoptosis of human eosinophils. Comparison between CD69 and CD95-mediated signalling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: A337
- Foerster M, Zaune A, Haefner D, Gardina P, Braun RK, Kroegel C. CD69-induzierte Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten. Beziehung zur *bcl-2*-Expression und zum CD95-Antigen. *Pneumologie* 2000, 54: S21.
- Foerster M, Knoechel B, Luttmann W, Virchow JC, Matthys H, Kroegel C. CD69-Kreuzvernetzung induziert Apoptose in aktivierten eosinophilen Granulozyten. *Pneumologie* 1997, 51: 188.
- Foerster M, Knoechel B, Julius P, Luttmann W, Kroegel C. Transkription, Expression und Engagement des CD69-Antigens. Identifikation eines neuen Apoptose-transduzierenden Oberflächenantigens. *Medizinische Klinik* 1997, 92: 107.

Vorträge

Weiterbildung der Klinik für Innere Medizin IV, Jena, 16.11.2000.

Foerster, M: CD69-induzierte Apoptose eosinophiler Granulozyten. Beziehung zur *bcl-2*-Expression und Caspasenaktivierung.

10. Kongress der ERS, Florenz, 03.09.2000.

Foerster M, Zaune A, Haefner D, Gardina P, Grahmann PR, Braun RK, Kroegel C: Molecular mechanism of ligand-associated apoptosis of human eosinophils. Regulation of *bcl-2* expression following occupation of CD69- and CD95-antigens.

41. Kongress der DGP, Hamburg, 01.03.2000.

Foerster, M, Zaune, A, Haefner, D, Gardina, P, Braun, RK, Kroegel, C: CD69-induzierte Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten. Beziehung zur *bcl-2*-Expression und zum CD95-Antigen.

Immunologisches Seminar, Jena, 16.02.1999.

Foerster, M: Molekulare Mechanismen der Rezeptor-vermittelten Apoptose eosinophiler Granulozyten. Bedeutung für Pathogenese und Therapie des Asthma bronchiale.

Weiterbildung der Klinik für Dermatologie, Jena, 21.10.1998.

Foerster, M: Molekulare Mechanismen der Rezeptor-vermittelten Apoptose eosinophiler Granulozyten. Bedeutung für Pathogenese und Therapie des Asthma bronchiale.

38. Kongreß der DGP, Freiburg, 5.3.-8.3.1997.

Foerster, M, Knoechel B, Luttmann W, Virchow JC, Matthys H, Kroegel C: CD69-Kreuzvernetzung induziert Apoptose in aktivierten eosinophilen Granulozyten.

Weiterbildung der Klinik für Innere Medizin IV, Jena, 10.07.1997.

Foerster, M: Molekulare Mechanismen der CD69-induzierten Apoptose eosinophiler Granulozyten. Bedeutung für Pathogenese und Therapie des Asthma bronchiale.

Preise

08.12.2002: Curt-Dehner-Preis der Curt-Dehner-Stiftung für die Arbeit:

Foerster M, Braun RK, Haefner D, Kroegel C. „*Bcl-2*-mediated regulation of CD69-induced apoptosis of human eosinophils. Identification and characterization of a novel receptor-induced mechanism and relationship to CD95-transduced signalling.“

Stipendien

08.10.1997 Förderstipendium für junge Wissenschaftler der FSU Jena
 NOVARTIS-Stiftung für Therapeutische Forschung

7.4 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 06.12.2004

Martin Förster

7.5 Erklärung zur Bewerbung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung des Verfahrens zum Erwerb des o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 06.12.2004

Martin Förster